

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914.

N° 13.

RECHERCHES SUR LA SYNTHÈSE BIOCHIMIQUE

DE

Quelques d-glucosides A au moyen de la glucosidase A

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 7 juillet 1914.

PAR

André AUBRY

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES.

JURY { MM. BOURQUELOT, Président.
GRIMBERT, Professeur.
HÉRISSEY, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1914



Digitized by the Internet Archive
in 2026

RECHERCHES SUR LA SYNTHÈSE BIOCHIMIQUE
DE
Quelques d-glucosides A au moyen de la glucosidase A

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 7 juillet 1914.

PAR

André AUBRY

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS
LICENCIÉ ÈS-SCIENCES.

JURY { MM. BOURQUÉLOT, Président.
GRIMBERT, Professeur.
HÉRISSEY, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1914



PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GAUTIER, Directeur, *, ☉ I.
 BOURQUELOT, Assesseur, *, ☉ I.
 E. MUSSON, Secrétaire, *, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, O. *, ☉ I. Botanique générale.
 VILLIERS, *, ☉ I. Chimie analytique.
 BOURQUELOT, *, ☉ I. Pharmacie galénique.
 GAUTIER, *, ☉ I. Chimie minérale.
 RADAIS, *, ☉ I. Cryptogamie.
 BÉHAL, O. *, ☉ I. Chimie organique.
 PERROT, *, ☉ I. Matière médicale.
 COUTIÈRE, *, ☉ I. Zoologie.
 BERTHELOT, ☉ I. Physique.
 GRIMBERT, *, ☉ I. Chimie biologique.
 MOUREU, Membre de l'Institut, *, ☉ I. Pharmacie chimique.
 LEBEAU, ☉ I. Toxicologie.
 DELÉPINE, ☉ I. Hydrologie et Hygiène.

Directeur honoraire : M. GUIGNARD, O. *, ☉ I.

Professeurs honoraires : MM. JUNGLEISCH, O. *, ☉ I.
 et BOUCHARBAT, O. *, ☉ I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET, ☉ I.	MM. GUÉRIN, ☉ I.
VALEUR, *, ☉ A.	GUÉGUEN, ☉ I.
BOUGAULT, ☉ A.	LUTZ, ☉ I.
TASSILLY, ☉ I.	HÉRISSEY, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. GUERBET, ☉ I. Minéralogie
 HONNORAT, ☉ I. Législation et Déontologie
 pharmaceutiques

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ☉ I. Chimie générale.
 COUSIN, ☉ I. Chimie analytique.
 SOUÈGES, ☉ A. Micrographie.
 MOURLOT, ☉ I. Physique.
 BARTHELAT, *, ☉ I. Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER, ☉ I.
Bibliothécaire en Chef : M. DORVEAUX, ☉ I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOURQUELOT

PHARMACIEN DE L'HÔPITAL LAENNEC
MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

Hommage de respect et de reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ HÉRISSEY

PHARMACIEN DE L'HÔPITAL BROUSSAIS.

En témoignage de bien sincère reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE.

A MA MÈRE. .

A MA FAMILLE.

INTRODUCTION.

A. CROFT HILL, en 1898, publia un certain nombre de recherches qui le conduisirent à cette conclusion que la maltase, ferment soluble qui dédouble le maltose en 2 molécules de glucose, serait également capable, dans des conditions appropriées, de reproduire cet hexobiose à partir du glucose lui-même ; l'action de la maltase serait donc réversible (1).

Il mettait en contact, à la température de 30°, un extrait de levure de bière riche en maltase avec une solution aqueuse concentrée de glucose, et constatait dans le mélange fermentaire une augmentation notable de la rotation droite primitive, ainsi qu'une diminution importante du pouvoir réducteur ; il ne put extraire du mélange le maltose dont il présu- mait la formation, mais il en retira un sucre nouveau, le révertose, auquel il attribua un pouvoir rotatoire : $\alpha_D = +91^\circ,5$ et sur les propriétés duquel il fournit fort peu de détails.

O. EMMERLING (2), reprenant les expériences de CROFT HILL, conclut à la formation, non de maltose, mais d'isomaltose et de dextrines.

Em. FISCHER et E. F. ARMSTRONG (3), en faisant agir la lactase,

(1) Reversible Zymohydrolysis ; *Journ. of the chem. Soc. of London*, LXXIII, 634, 1898 ; et Reversibility of Enzyme, or ferment action ; *ibid.*, LXXXIII, 578, 1903.

(2) Synthetische Wirkung der Hefenmaltase ; *Ber. chem. Ges.*, XXXIV, p. 600, 1901.

(3) Synthese ciniger neuer Disaccharide ; *Ber. chem. Ges.*, p. 3144, 1902.

sous forme de macération aqueuse de grains de Képhir, sur un mélange de glucose et de galactose en solution aqueuse concentrée, obtinrent non du lactose, mais un sucre qu'ils ont appelé isolactose qui n'a d'ailleurs pas été isolé à l'état pur et qu'ils ont seulement caractérisé par sa combinaison avec la phénylhydrazine.

Les expériences entreprises par WROBLEWSKI (1), puis par A. W. VISSER (2) dans le but d'établir l'action réversible de l'invertine ne sont pas plus concluantes ; il en est de même des recherches de G. EMMERLING (3) et de celles de W. VISSER (4) effectuées en vue d'obtenir synthétiquement, à l'aide de ferments solubles, l'amygdaline et la salicine.

A la suite de ces travaux, quelques savants avaient admis le fait de la réversibilité des actions fermentaires, mais il faut cependant bien reconnaître qu'aucun des faits précédemment énumérés n'avait apporté la preuve de l'action réversible d'un enzyme quelconque agissant sur les hydrates de carbone ou les glucosides.

C'est aux travaux de Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL que nous devons la démonstration irréfutable de cette réversibilité (5).

Ces deux auteurs, à la suite d'essais infructueux effectués

(1) *Bull. Acad. des Sciences de Cracovie*, février 1901.

(2) Reaktionsgeschwindigkeit und chemisches Gleichgewicht in homogenem Systemen und Anwendung auf Enzymwirkungen; *Ztschr. f. physikalische-Chemie*, LII, p. 258, 1905.

(3) Synthetische Wirkung der Hefenmaltase ; *Ber. chem. Ges.*, XXXIV, p. 3810, 1901.

(4) *Loc. cit.*

(5) Sur une réaction synthétisante de l'émulsine ; *Journ. de Pharm. et de Chim.* (7), V, p. 563, 1912.

De l'action hydrolysante et de l'action synthétisante de l'émulsine dans l'alcool méthylique. Obtention du méthylglucoside β ; *id.*, (7), VI, p. 49, 1912.

Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine. La réversibilité des actions fermentaires ; *id.*, (7), VI, p. 165, 1912.

en vue d'opérer la synthèse de la salicine par action de l'émulsine sur une solution alcoolique de glucose et de saligénine, établirent que l'émulsine avait la propriété de combiner le glucose à l'alcool éthylique ; il se forme au sein du mélange de l'éthylglucoside β . Ce même glucoside, en solution aqueuse, est d'ailleurs rapidement hydrolysé par le ferment qui a effectué sa synthèse.

Ils ont ensuite établi que, dans un liquide alcoolique déterminé, l'action hydrolysante et l'action synthétisante de l'émulsine s'arrêtent toutes deux lorsque le rapport entre les poids du glucose et du glucoside ont atteint une même valeur, variable d'ailleurs avec la concentration alcoolique du mélange (1).

Le fait de la réversibilité de l'action de l'émulsine se trouvait ainsi nettement établi ; c'est là une notion qui a permis dans la suite de réaliser, à partir du glucose-d, la synthèse biochimique de d-glucosides β dérivés de nombreux alcools et, à l'aide d'autres ferments que l'émulsine, celle de glucosides de différents sucres. Ce fait permet de penser que tous les glucosides pourront être obtenus de même.

Les recherches effectuées par Em. BOURQUELOR et ses élèves ont, en effet, conduit actuellement à l'obtention de composés, se rattachant à quatre séries distinctes.

d-glucosides β .

d-glucosides α .

d-galactosides β .

d-galactosides α .

Les glucosides β et les galactosides β ont été obtenus à l'aide de l'émulsine des amandes qui renferme, à côté de

(4) L'activité hydrolysante et l'activité synthétisante de l'émulsine sont identiques ; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 15, 1913.

nombreux autres ferments, une glucosidase β et une galactosidase β .

La synthèse des glucosides α et des galactosides α a été effectuée à l'aide de ferments contenus dans la levure de bière basse.

En partant du même principe, Em. BOURQUELOT, H. HÉRISSEY et J. COIRRE ont pu récemment réaliser la synthèse biochimique d'un sucre du groupe des hexobioses, le *gentiobiose* (1).

Dans leurs thèses, présentées récemment, Em. VERDON (2) et J. COIRRE (3) ont fixé d'une façon qui semble définitive les conditions pratiques les mieux appropriées à l'obtention du *méthylglucoside* β et de l'*éthylglucoside* β . En suivant les indications fournies par ces travaux, il est possible aujourd'hui d'obtenir, d'une façon très pratique, de fortes proportions de ces glucosides.

Sur les conseils de M. le Professeur BOURQUELOT, je me suis proposé d'établir les meilleures conditions d'obtention des d-glucosides α , tout au moins de ceux de ces glucosides dérivés d'alcools de poids moléculaires peu élevés.

Mes recherches ont porté sur la synthèse biochimique du *méthylglucoside* α , de l'*éthylglucoside* α , du *propylglucoside* α , du *butylglucoside* α et de l'*isobutylglucoside* α . Le ferment dont l'action synthétisante a été utilisée au cours de ces essais, la *glucosidase* α , se trouve particulièrement dans la levure de bière basse, séchée à l'air. Au début de mon travail, j'ai dû chercher les meilleures formes d'utilisation

(1) Synthèse biochimique d'un sucre du groupe des hexobioses, le *gentiobiose*; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VIII, p. 441, 1913.

(2) Contribution à l'étude de l'action synthétisante de l'émulsine; *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1913.

(3) Recherches sur la synthèse biochimique de l'éthylglucoside β par l'émulsine; *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1913.

de la glucosidase α , en même temps que j'étudiais les sources les plus favorables à l'obtention du ferment. Cette étude fait l'objet du Chapitre I.

J'ai ensuite déterminé la quantité de ferment nécessaire à l'obtention d'une action synthétisante notable, ainsi que l'influence de la proportion d'enzyme employée sur la limite de la réaction (Chapitre II).

Le Chapitre III est consacré à l'étude de l'action synthétisante de la glucosidase α s'exerçant dans des alcools méthylique, éthylique, propylique, butylique, isobutylique de concentrations variées, la proportion de glucose contenue dans le mélange fermentaire étant fixe.

J'ai étudié au Chapitre IV l'influence d'une proportion de plus en plus grande de glucose sur la limite de l'action synthétisante.

Le Chapitre V renferme les résultats de quelques essais effectués en vue d'opérer la synthèse des glucosides en présence de produits étrangers à la réaction : toluène, acétone.

Dans le Chapitre VI, j'étudie la température de destruction de la glucosidase α en milieu alcoolique (alcool méthylique), ainsi que l'influence de la température sur la limite de la réaction synthétisante.

J'ai réuni, dans le Chapitre VII, les conditions les plus favorables à la préparation du méthylglucoside α et de l'éthylglucoside α ; l'établissement de ces conditions découle tout naturellement de la comparaison des résultats obtenus au cours des chapitres précédents.

Dans le Chapitre VIII, j'ai relaté un certain nombre d'essais touchant la question de l'individualité de la glucosidase α . Certaines expériences montrent nettement que, contrairement à l'opinion souvent admise, ce ferment n'est nullement identique à la maltase.

Pour préparer par voie biochimique les glucosides d'alcools, on doit mettre en présence : d'une part le *glucose-d* en solution dans l'alcool voulu, d'autre part le *ferment*.

Le glucose-d employé au cours de ce travail a été obtenu en faisant recristalliser le glucose purifié du commerce dans l'alcool éthylique à 95°. On portait au bain-marie bouillant, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, de l'alcool à 95° en présence d'un excès de glucose. Au bout d'une demi-heure d'ébullition, pendant laquelle on agitait fréquemment le contenu du ballon, la solution alcoolique bouillante était filtrée, puis amorcée avec un peu de glucose cristallisé. Au bout de 3 ou 4 jours, cette solution fournissait un dépôt abondant de glucose cristallisé qu'on essorait à la trompe, lavait avec un peu d'alcool à 95° et faisait sécher à l'étuve à 30°.

Le pouvoir rotatoire du produit obtenu a été trouvé : $\alpha_D = + 51^{\circ},95$, en solution aqueuse.

$$(\alpha = + 4^{\circ}6' = + 4^{\circ},10, \mu = 0 \text{ gr.}, 9865, c = 25 \text{ cm}^3, l = 2, \\ t = + 18^{\circ}).$$

Je rappellerai ici que le pouvoir rotatoire du glucose est plus élevé en solution alcoolique qu'en solution aqueuse.

Ainsi, Em. VERDON (1), étudiant le pouvoir rotatoire du glucose en solution dans l'alcool méthylique, a trouvé :

Dans l'alcool méthylique aqueux :

$$(30 \text{ gr. d'alcool pour } 100 \text{ gr. de mélange}) \alpha_D = + 55^{\circ},60.$$

$$(60 \text{ gr. d'alcool pour } 100 \text{ gr. de mélange}) \alpha_D = + 56^{\circ},86.$$

J. COIRRE (2), faisant les mêmes déterminations sur des solutions faites dans l'alcool éthylique, donne les chiffres suivants :

Dans l'alcool éthylique à 30° (degrés centésimaux) :

$$\alpha_D = + 52^{\circ},8.$$

Dans l'alcool éthylique à 60° (degrés centésimaux) :

$$\alpha_D = + 54^{\circ},2.$$

(1) *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1913, p. 5.

(2) *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1913, p. 4.

Toutefois, comme je n'ai eu l'occasion d'opérer qu'en solutions de faible titre alcoolique, l'erreur faite dans les calculs en employant toujours le pouvoir rotatoire déterminé en solution aqueuse est pratiquement négligeable.

Ainsi, une solution renfermant 1 gr. de glucose dans 100 cm³ d'alcool méthylique à 30 gr. pour 100 cm³, accusera une rotation polarimétrique :

$$\alpha = \frac{\alpha_0 \times l \times p}{V} = \frac{+ 55,6 \times 2 \times 1}{100} = + 1^{\circ},11 = + 1^{\circ}6'.$$

En solution aqueuse, la rotation calculée serait :

$$\alpha = \frac{+ 51,9 \times 2 \times 1}{100} = + 1^{\circ},03 = \text{sensiblement } + 1^{\circ}2'.$$

Comme nous opérons habituellement, au cours de ce travail, sur des solutions méthyliques de concentration nettement inférieure à 30 gr. dans 100 cm³, l'erreur maxima faite dans les calculs en prenant comme pouvoir rotatoire du glucose : $\alpha_0 = + 51^{\circ},95$ sera toujours inférieure à 4 minutes. La différence sera encore plus faible dans les solutions éthyliques de glucose, puisqu'une solution renfermant 1 gr. de ce sucre dans 100 cm³ d'alcool éthylique à 30° aura une rotation de :

$$\alpha = \frac{+ 52,8 \times 2 \times 1}{100} = + 1^{\circ},056 = + 1^{\circ}3'.$$

soit une erreur maxima de 1 minute.

D'autre part, le pouvoir rotatoire du glucose varie peu avec la concentration, de sorte qu'il est inutile d'appliquer la formule de Tollens.

On a employé, comme source de ferment, la levure de bière basse, séchée à l'air, provenant de deux sources différentes.

Une partie de la levure a été obtenue de la façon suivante : La levure de bière fraîche, fournie par la brasserie, a été agitée avec plusieurs volumes d'eau distillée, puis on a laissé déposer et on a décanté l'eau qui surmontait la levure. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, la levure a été essorée à la trompe et mise à sécher en couches peu épaisses à l'étuve à 30-33°. Après dessiccation complète, on a passé la masse au moulin à broyer et on a obtenu un produit pulvérulent, gris-brun, d'une odeur légèrement putride.

D'autre part, beaucoup des essais ont été effectués avec une levure de bière en poudre, achetée toute préparée et que des essais préliminaires nous avaient montrée riche en glucosidase α . On a pris soin d'effectuer toutes les séries d'essais se rattachant à un ordre déterminé de recherches avec le même échantillon de levure. C'est là une précaution indispensable, car j'ai constaté, au cours de mes premières expériences, qu'il pouvait y avoir une très grande différence entre l'activité d'échantillons de levure de provenances différentes.

Il est utile, avant d'entreprendre l'exposé de ce travail, de donner quelques indications sur la méthode employée dans la préparation des mélanges fermentaires.

Dans tous les essais effectués, les proportions d'alcool ont été déterminées en poids et les mélanges fermentaires complétés à un volume déterminé (généralement 100 cm³). Tous les liquides renferment donc un *poids* d'alcool déterminé dans le *volume* indiqué.

On a toujours pris la précaution de ne jamais mettre en contact direct le ferment avec l'alcool pur. Pour cela, l'alcool a été dilué avec de l'eau distillée en proportion un peu inférieure à la quantité finale. On a ajouté ensuite le glu-

cose (1), puis le ferment, et complété le volume désiré avec un peu d'eau distillée. De cette façon, la glucosidase α ne s'est jamais trouvée en contact avec une solution alcoolique notablement plus concentrée qu'il n'est indiqué. Cette précaution est indispensable à la bonne marche des essais, car, comme on le verra plus loin, l'action nocive de l'alcool fort sur le ferment se manifeste d'une façon extrêmement rapide.

On a effectué les nombreux dosages de sucre réducteur que cette étude a nécessités en utilisant les tables qui ont été publiées par G. BERTRAND.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de M. le Professeur BOURQUELOT, à qui je tiens à exprimer ici toute ma gratitude pour la bienveillance qu'il m'a témoignée et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués.

Je tiens aussi à remercier M. HÉRISSEY, agrégé près l'Ecole supérieure de Pharmacie, qui n'a jamais cessé, depuis le début de mes études pharmaceutiques, de me prodiguer ses encouragements et ses meilleurs conseils. Grâce à lui, j'ai pris goût aux recherches scientifiques, et je ne saurais lui avoir trop de reconnaissance pour m'avoir fait profiter, avec une patience jamais démentie, de sa grande expérience.

Je dois aussi exprimer à M. BRIDEL, préparateur du cours de Pharmacie Galénique, toute ma gratitude pour les bons conseils qu'il m'a prodigués au cours de ce travail.

(1) Le glucose a toujours été introduit dans les mélanges fermentaires de la façon suivante :

Pour chaque série d'essais, on a préparé une solution aqueuse de glucose renfermant sensiblement 1 gr. de ce sucre dans 10 cm³, et on a introduit 10 cm³ de cette solution dans chaque mélange fermentaire. Les pesées de glucose n'ont pas été effectuées à la balance de précision, ce qui explique les légères différences des rotations initiales dans des séries différentes. Le point essentiel, qui a toujours été observé, est l'addition de quantités égales de glucose dans les essais se rapportant à une même série d'expériences.

CHAPITRE PREMIER.

Etude des différentes formes d'utilisation de la glucosidase α employée comme agent synthétisant.

La levure de bière de fermentation basse, séchée à l'air, est la seule source pratiquement utilisable de glucosidase α connue actuellement. Le ferment qui nous intéresse se trouve dans cette levure, mélangé à d'autres enzymes et à des substances inactives ; il n'a pas été possible jusqu'ici de l'en extraire, de manière à obtenir, comme c'est le cas pour l'émulsine, un produit très actif sous un faible volume. On est réduit à effectuer la synthèse biochimique des glucosides α en employant comme source de glucosidase α , soit la poudre de levure elle-même, soit un extrait ou un macéré aqueux de cette levure.

Ces divers procédés présentent l'inconvénient d'introduire dans le mélange fermentaire, en même temps que des enzymes étrangers à la réaction provoquée, une proportion notable d'impuretés qui, dans certains cas, rendront ultérieurement très pénible l'extraction du glucoside formé.

Je me suis proposé d'étudier comparativement les différentes formes (poudre de levure, macéré, extrait) sous lesquelles il était possible d'employer la glucosidase α , afin d'établir laquelle de ces formes présentait le plus d'avantages.

L'activité synthétisante des différentes préparations de levure employées a été déterminée en opérant dans un mélange fermentaire qui consistait en une solution hydroalcoolique

lique de glucose renfermant, dans 100 cm³, 1 gr. de glucose et 16 gr. d'alcool méthylique. On a dû choisir un liquide de titre alcoolique tel que l'activité du ferment ne puisse être amoindrie par un contact prolongé avec l'alcool ; des expériences relatées plus loin montreront précisément que, pour éviter toute complication due à l'action nocive de l'alcool méthylique sur le ferment, il faut employer des mélanges fermentaires renfermant moins de 20 gr. de cet alcool dans 100 cm³ de mélange final.

Emploi de la poudre de levure.

Le procédé le plus simple d'utilisation de la levure de bière pulvérisée, consiste à introduire cette poudre elle-même dans le mélange fermentaire. Comme on va le voir, on n'obtient pas, en opérant ainsi, de résultats bien satisfaisants. J'ai effectué un essai de synthèse en introduisant 5 gr. de levure sèche pulvérisée dans une solution renfermant, pour 100 cm³, 1 gr. de glucose et 16 gr. d'alcool méthylique. On a bientôt observé un dégagement gazeux abondant et un retour de la rotation polarimétrique vers la gauche. Cette rotation est passée, en moins de 4 jours, de + 58° à - 2°, et, durant le même laps de temps, le sucre réducteur a entièrement disparu du mélange. Il y a donc eu fermentation alcoolique du glucose sous l'influence de la levure. En effet, cet organisme, bien que desséché et pulvérisé n'a pas perdu son pouvoir de déterminer la fermentation alcoolique ; d'autre part, la proportion d'alcool employée dans les mélanges fermentaires est également trop faible pour empêcher cette activité de la levure de se manifester. J'ai effectué un autre essai en introduisant seulement 1 gr. de levure en poudre dans un mélange fermentaire identique au précédent. La rotation polarimétrique du mélange est, dans ce cas, passée de + 58° à + 1°58' et le dosage du glucose à l'arrêt de la réaction a indiqué la présence de 0 gr., 410 de glucose libre. Si on calcule la rotation polarimétrique que devrait avoir ce mélange en supposant que le glucose disparu s'est in-

tégralement combiné à l'alcool méthylique, on voit que cette rotation devait être voisine de $+ 2^{\circ}25'$. Comme le mélange ne présente qu'une rotation de $+ 1^{\circ}58'$, on doit conclure qu'une partie du glucose a disparu par fermentation.

On voit donc que l'emploi direct de la poudre de levure expose à de graves mécomptes, puisqu'on a toujours à craindre une fermentation alcoolique du glucose. En plus de cet inconvénient, on introduit ainsi dans le mélange fermentaire une proportion d'impuretés vraisemblablement supérieure à celle qui résulte de l'emploi de macérés aqueux de levure. Ces faits expliquent les résultats singuliers que certains auteurs ont obtenu en mettant en contact une poudre de levure avec une solution glycérinée de glucose. Ces auteurs, en effet, ont constaté, au cours de la réaction, une diminution du pouvoir réducteur du mélange, en même temps qu'un retour de la rotation polarimétrique vers la gauche.

Or, Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL (1) ont montré que, en opérant à l'abri de toute cause d'erreur, on devait au contraire constater une augmentation de la rotation droite primitive du mélange.

Emploi de macérés de levure.

Em. BOURQUELOT, H. HÉRISSEY et M. BRIDEL (2), au cours de leurs recherches sur la synthèse biochimique des glucosides α , employaient une macération aqueuse de levure préparée en mettant en contact 1 partie de levure avec 10 à 20 parties d'eau toluénée.

J'ai cherché à déterminer le temps nécessaire à l'obtention d'un macéré suffisamment actif, ainsi que la proportion d'eau

(1) Synthèse biochimique de glucosides d'alcools polyvalents : glucosides de la glycérine et du glycol ; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 489, 1913.

(2) Synthèse de glucosides α à l'aide de la glucosidase α , enzyme contenu dans la levure basse séchée à l'air : méthylglucoside α et éthylglucoside α ; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 145, 1913 et :

Synthèse biochimique de glucosides d'alcools à l'aide de la glucosidase α : propylglucoside α et allylglucoside α ; *id.* ; (7), VII, p. 525, 1913.

nécessaire pour extraire aussi complètement que possible la glucosidase α de la poudre de levure ; enfin, j'ai cherché si l'addition d'antiseptiques à l'eau destinée à la macération rendait le macéré plus ou moins actif.

1° Durée optima de la réaction. — J'ai préparé des macérés de levure en mettant en contact, à la température du laboratoire (18-20°), 20 cm³ d'eau avec 1 gr. de levure. Ces macérés ne différaient entre eux que par la durée du contact entre la levure et l'eau. Chacun d'eux avait été additionné de 3 cm³ de toluène pour 100 cm³ de liquide. Après filtration, chaque macéré, à la dose de 20 cm³ correspondant à 1 gr. de levure, a été complété au volume de 100 cm³ avec 10 cm³ de solution de glucose à 1 gr. pour 10 cm³, et 16 gr. d'alcool méthylique dilué avec la quantité d'eau suffisante.

La durée approximative de chaque réaction synthétisante a été déterminée au moyen d'examen polarimétriques effectués tous les 4 jours ; la limite de la synthèse a été établie par un dosage de sucre réducteur effectué à l'arrêt de la réaction. La durée de la macération (au moins pour une durée supérieure à 1 h. 15 minutes) s'est montrée sans influence sur la limite de l'action synthétisante du ferment. La rotation polarimétrique de tous ces mélanges fermentaires est passée de + 1° à + 2°10' (1 = 2) et on a constaté, dans chacun des mélanges, la combinaison de 0 gr.,563 de glucose soit 56,3 pour 100 du glucose en solution.

La durée seule de la synthèse a été variable avec les différents macérés. Le macéré de 24 heures s'est montré sensiblement aussi actif que celui de 52 heures, puisque chacun des mélanges fermentaires renfermant ces macérés a atteint l'état d'équilibre en 15 à 19 jours. Par contre, le macéré de 75 minutes s'est révélé peu riche en glucosidase α puisqu'il lui a fallu de 30 à 34 jours pour atteindre la limite de la réaction.

Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau suivant :

DURÉE de la macération	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction synthétisante	PROPORTION DE GLUCOSE combiné à l'arrêt
52 heures.....	15-19 jours	56,3 pour 100
24 —	15-19 —	56,3 —
1 — 15 minutes.	30-34 —	56,3 —

Nous pouvons conclure de ces résultats qu'il est inutile de prolonger indéfiniment la durée de la macération, puisqu'un contact de 24 heures fournit un macéré possédant le maximum d'activité. Toutefois, une macération de quelques heures suffira, à la rigueur, à fournir un liquide suffisamment riche en glucosidase α .

2° Addition d'un antiseptique à la macération.

— J'ai entrepris un certain nombre d'expériences en vue de m'assurer si l'addition d'un antiseptique à l'eau destinée à la macération modifiait la valeur fermentaire du macéré. Dans ce but, j'ai effectué un certain nombre de macérations d'une durée uniforme de 24 heures, telles que 20 cm³ de chacune d'elles correspondait à 1 gr. de levure sèche. L'une d'elles ne renfermait aucun antiseptique, les autres contenaient respectivement l'un des composés suivants :

Chloroforme à la dose de 2 cm³,5 pour 100 cm³ (par conséquent un excès).

Toluène à la dose de 2 cm³, 5 pour 100 cm³ (par conséquent un excès).

Oxyde jaune de mercure à la dose de 0 gr.,06 pour 100 cm³ (resté au moins partiellement non dissous).

Cyanure de mercure à la dose de 0 gr.,12 pour 100 cm³.

On a ensuite préparé des mélanges fermentaires renfermant, dans 100 cm³, 20 cm³ de chaque macéré filtré, 1 gr. de glucose et 16 gr. d'alcool méthylique.

Comme dans les expériences précédentes, on a déterminé la durée de la réaction par de fréquents examens polarimétriques. La proportion de glucose non combiné a été dosée à l'arrêt de la réaction. Le macéré additionné de toluène s'est montré aussi actif que celui qui ne renfermait aucun antiseptique, puisqu'on a retrouvé, à l'arrêt de la réaction, 0 gr., 437 de glucose dans le premier et 0 gr., 444 dans le second, et que cette limite a été atteinte dans le même laps de temps (15 à 19 jours.)

Le chloroforme semble, au contraire, avoir eu une action empêchante très nette. On a trouvé, à l'arrêt de la réaction, dans le mélange fermentaire renfermant le macéré chloroformé, 0 gr., 477 de glucose, proportion supérieure à celle qui était restée non combinée dans les autres liquides. De plus, la synthèse s'est effectuée en 30-34 jours, soit une durée à peu près double de celle des essais précédents.

Les macérés additionnés d'oxyde jaune de mercure et de cyanure de mercure, à doses très faibles cependant, avaient perdu toute activité synthétisante; la rotation polarimétrique des liquides renfermant ces macérés est restée de $+ 1^{\circ}$ pendant toute la durée de l'expérience. Les résultats de ces essais sont groupés dans le tableau suivant :

NATURE DE L'ANTISEPTIQUE contenu dans la macération	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	PROPORTION DE GLUCOSE combiné à l'arrêt
Pas d'antiseptique.....	15-19 jours	55,6 pour 100
Toluène (2 cm ³ , 5 pour 100 cm ³).....	15-19 —	56,3 pour 100
Chloroforme (2 cm ³ , 5 pour 100 cm ³).....	30-34 —	52,3 pour 100
Oxyde jaune de mercure (0 gr., 06 p. 100 cm ³)	Pas de synthèse	0
Cyanure de mercure (0 gr., 12 p. 100 cm ³)	Pas de synthèse	0

Il est à remarquer que les sels de mercure, même à des doses extrêmement faibles détruisent rapidement la glucosidase α .

Ainsi, la très faible proportion d'oxyde jaune de mercure qui a pu se dissoudre dans le macéré de levure à la faveur de l'acidité de ce liquide, a suffi à empêcher toute action synthétisante. Il en a été de même du cyanure de mercure à la dose de 0 gr. 42 dans 100 cm³ de macéré.

Le toluène, *en milieu aqueux*, ne semble avoir aucune action nocive sur le ferment. Nous verrons plus loin qu'il n'en est pas de même lorsque la glucosidase α se trouve en solution alcoolique.

Le chloroforme, qui pourtant passe pour favoriser la diffusion des ferments intra-cellulaires, diminue sensiblement de moitié l'activité du macéré.

Le fluorure de sodium, à la dose de 1 gr. dans 100 cm³ d'eau destinée à la macération, s'est montré un très bon antiseptique, n'ayant ultérieurement aucune action empêchante sur la marche de la réaction synthétisante. Cet essai, n'ayant pas été effectué dans les mêmes conditions que les expériences précédentes, n'a pu leur être comparé. C'est pourquoi il n'est pas mentionné au tableau précédent.

En résumé, il semble préférable d'additionner de toluène l'eau destinée à la préparation de la macération de levure, car cet antiseptique ne semble avoir, *en milieu aqueux*, aucune action nocive sur la glucosidase α .

3° Influence de la proportion d'eau employée dans la macération. — Il était intéressant de se rendre compte si la proportion d'eau mise en contact avec une quantité déterminée de levure avait une influence sur l'activité du macéré ou, autrement dit, si, à l'aide d'une forte proportion de dissolvant, on pourrait extraire une quantité de glucosidase α plus grande qu'avec une faible quantité d'eau.

Dans ce but, j'ai préparé un certain nombre de macérations d'une durée uniforme de 24 heures. Les macérés étaient

tels que 1 gr. de levure était mis en contact avec : 5, 10, 20, 40 parties d'eau. Après filtration, la proportion de chaque macéré correspondant à 1 gr. de levure, soit 5 cm³ pour le premier, 10 cm³ pour le second, 20 cm³ pour le troisième, 40 cm³ pour le quatrième, a été introduite dans un mélange fermentaire renfermant en outre : 1 gr. de glucose, 16 gr. d'alcool méthylique et la quantité d'eau suffisante pour compléter le volume de 100 cm³. On a suivi la marche de la réaction synthétisante par de fréquents examens polarimétriques et dosé le sucre réducteur à l'arrêt de cette dernière.

Dans chacun des mélanges fermentaires, la rotation polarimétrique est passée de + 58° à + 2°10' ($l = 2$) en un laps de temps compris entre 20 et 40 jours.

Le sucre réducteur, dosé à l'arrêt, s'est trouvé dans tous les mélanges en proportions sensiblement égales. Ainsi, on a retrouvé dans le mélange contenant le macéré à 1 gr. pour 5 cm³, 0 gr., 451 de glucose, dans celui renfermant le macéré à 1 gr. pour 10 cm³, 0 gr., 458, et dans les mélanges renfermant les macérés à 1 pour 20 et à 1 pour 40, respectivement 0 gr., 458 et 0 gr., 472.

Les résultats de cette expérience sont réunis dans le tableau suivant :

CONCENTRATION DU MACÉRÉ	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	PROPORTION DE GLUCOSE combiné à l'arrêt
1 gr. de levure pour 5 cm ³ de macéré	20-24 jours	54,9 pour 100
1 gr. — — 10 —	20-24 —	54,2 —
1 gr. — — 20 —	20-24 —	54,2 —
1 gr. — — 40 —	20-24 —	52,7 —

Nous devons conclure de ces résultats que la proportion d'eau mise en contact avec une quantité déterminée de poudre de levure n'a pas sensiblement d'influence sur l'acti-

vité du macéré ; seule, la proportion de levure employée est capable de faire varier les résultats, ainsi que nous le verrons dans un prochain chapitre. On peut donc, suivant les besoins, faire des macérés plus ou moins concentrés. Les macérés à 1 pour 5 et à 1 pour 10 s'emploieront lorsqu'il sera nécessaire d'obtenir la glucosidase α sous un petit volume. Par contre, dans la majorité des cas, on aura avantage à employer un macéré à 1 pour 20, car la filtration des macérés plus concentrés se fait beaucoup plus lentement et plus difficilement que dans ce dernier cas.

Emploi d'un extrait de levure.

On a vu plus haut que la préparation d'un macéré de levure suffisamment actif exigeait une durée minima de quelques heures. De plus, l'introduction d'un macéré dans un mélange fermentaire en modifie notablement le volume, de sorte qu'on ne peut, au cours d'un essai, ajouter au mélange une nouvelle quantité de ferment sans modifier profondément les conditions de l'expérience. Il serait très avantageux de posséder un produit renfermant la glucosidase α sous un très petit volume, de la même façon que l'émulsine renferme une glucosidase β très active dans un volume pratiquement négligeable. Ces considérations m'ont amené à tenter la préparation d'extraits de levure qu'on pourrait tenir en réserve et qui renfermeraient la glucosidase α sous un très faible volume.

J'ai d'abord tenté d'évaporer un extrait de levure à 1 gr. pour 20 cm³, dans le vide sulfurique, sous une faible épaisseur. J'ai obtenu, au fond de la capsule ayant contenu le macéré, une mince couche d'un extrait brun, presque sec. Cet extrait s'est montré très peu actif au point de vue synthétisant, puisque, mis en solution dans l'eau et additionné de 1 gr. de glucose et de 16 gr. d'alcool méthylique pour un volume total de 100 cm³, l'extrait correspondant à 1 gr. de levure n'a provoqué qu'une augmentation de la rotation polarimétrique de 40° vers la droite en 60 jours, à la tempé-

rature du laboratoire (18-20°), alors qu'un témoin préparé avec un macéré non desséché, passait en 24 jours de $+1^{\circ}$ à $+2^{\circ}10'$.

J'ai pensé obtenir un produit plus actif en évaporant des solutions plus concentrées de ferment, et j'ai tenté de dessécher dans les mêmes conditions un macéré de levure à 1 pour 5. Ce macéré a été placé dans une capsule à fond plat, sous une faible épaisseur ; on a introduit cette capsule dans une cloche à vide renfermant en outre de l'acide sulfurique, et une petite quantité de chaux vive destinée à absorber les traces de vapeurs acides qui pourraient se dégager. On a obtenu, après un séjour de plusieurs jours dans le vide, un extrait presque sec, qui a été reconnu également très peu actif puisque, introduit à la dose de 0 gr.,25 (correspondant à 0 gr.,50 environ de levure) dans 100 cm³ d'un mélange renfermant 1 gr. de glucose et 16 gr. d'alcool méthylique, il a seulement fait passer en 40 jours la rotation polarimétrique du mélange de $+1^{\circ}$ à $+1^{\circ}44'$.

En raison du peu d'activité des extraits obtenus par ce procédé, j'ai tenté de préparer un extrait de levure dans le vide, en présence de chlorure de calcium fondu. J'ai préparé dans ce but, un macéré de levure à 1 gr. pour 5 cm³, en laissant en contact la levure avec l'eau toluénée pendant 24 heures.

Après filtration, le liquide a été réparti dans des capsules de verre à fond plat, de telle sorte que chaque capsule renfermât 5 cm³ de macéré correspondant à 1 gr. de levure.

Ces capsules ont été placées dans une cloche, en présence d'un cristalliseur renfermant du chlorure de calcium fondu.

On a ensuite fait le vide dans la cloche au moyen de la trompe à eau. Au bout de 4 jours, les capsules renfermaient une mince couche d'extrait gris, entièrement sec et d'une odeur très faible.

On a essayé l'activité de cet extrait en dissolvant la quantité correspondant à 1 gr. de levure dans une solution hydroalcoolique de glucose renfermant, pour 100 cm³ de mélange, 1 gr. de glucose et 16 gr. d'alcool méthylique. La rotation polarimétrique du mélange est passée de $+1^{\circ}$ à $+2^{\circ}12'$ en

moins de 22 jours ; un mélange fermentaire témoin, préparé avec un macéré correspondant à la même quantité de levure a mis sensiblement le même temps pour accomplir la même réaction synthétisante. Cet extrait peut donc être considéré comme aussi actif que le macéré dont il provient.

Les indications fournies par les recherches exposées dans ce chapitre peuvent être résumées de la façon suivante :

D'une façon générale, la glucosidase α s'emploiera de préférence sous forme de macéré aqueux à 1 gr. pour 10 cm³ ou pour 20 cm³ d'eau additionnée d'une petite quantité de toluène.

La durée de la macération sera de 24 heures ; toutefois, on pourra la réduire à quelques heures en cas de nécessité.

Si on désire obtenir le ferment sous un volume moindre, on pourra sans inconvénient préparer, dans les mêmes conditions, un macéré à 1 gr. pour 5 cm³.

Enfin, si certaines expériences nécessitent l'emploi du ferment sous une forme telle qu'il n'occupe pas de volume appréciable, on préparera un extrait sec de levure en évaporant un macéré à 1 gr. pour 5 cm³, sous une faible épaisseur, dans le vide, en présence de chlorure de calcium fondu. On évitera toujours d'opérer cette dessiccation en présence d'acide sulfurique puisque, dans les expériences où nous avons utilisé cet acide comme desséchant, on a constaté une très grande diminution de l'activité du ferment.

CHAPITRE II.

Influence de la proportion de ferment sur la marche de l'action synthétisante.

Les recherches effectuées par Em. BOURQUELOT et Em. VERDON (1) et par J. COIRRE (2), en vue d'étudier l'influence de la proportion d'émulsine sur la limite de la synthèse biochimique du méthylglucoside β et de l'éthylglucoside β ont établi que la proportion d'enzyme employée est sans influence sur la limite de l'action fermentaire. La quantité d'émulsine utilisée modifie uniquement la vitesse de la réaction, de telle sorte que celle-ci s'effectue dans un temps d'autant plus court que la proportion de ferment est plus forte.

Toutefois, il faut remarquer que ces auteurs employaient comme source de ferment un produit très riche en glucosidase β ; d'autre part, ils effectuaient toujours leurs essais relatifs à cet ordre de recherches en introduisant dans 400 cm³ de chaque mélange fermentaire au moins 0 gr.,20 d'émulsine ce qui constitue en réalité une proportion de ferment susceptible d'une très grande activité.

J'ai institué quelques expériences dans le but de vérifier si la glucosidase α se comportait comme la glucosidase β .

(1) Em. BOURQUELOT et Em. VERDON. — La réversibilité des actions fermentaires : émulsine et méthylglucoside β ; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 379, 1913.

(2) Em. BOURQUELOT et J. COIRRE. — Données nouvelles sur la réversibilité de l'émulsine; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 236, 1913.

J'ai préparé dans ce but des mélanges fermentaires en employant des proportions de levure d'abord extrêmement faibles, puis de plus en plus considérables.

Afin d'éviter l'action nocive de l'alcool, tous les essais ont été effectués dans des solutions renfermant, pour 100 cm³, 1 gr. de glucose et 16 gr. d'alcool méthylique absolu. Ces solutions renfermaient respectivement : 0 cm³, 5, 1 cm³, 2 cm³, 3 cm³, 4 cm³, 5 cm³, 10 cm³, 20 cm³, 40 cm³ d'un macéré aqueux toluéné de levure à 1 pour 20, soit la quantité correspondant à : 0 gr., 025, 0 gr., 05, 0 gr., 10, 0 gr., 15, 0 gr., 20, 0 gr., 25, 0 gr., 50, 1 gr., 2 gr. de levure dans 100 cm³ du mélange final.

Ces mélanges ont été conservés à la température ordinaire du laboratoire (18-20°); on a suivi la marche de l'action synthétisante par de fréquents examens polarimétriques.

Comme les différences dans les rotations étaient parfois très faibles, on a trouvé une indication plus précise dans de nombreux dosages de sucre réducteur, effectués au cours de cette expérience.

L'action synthétisante étant terminée dans tous les mélanges, on a constaté que, lorsqu'on n'avait employé que de faibles quantités de ferment, la proportion de glucose combinée était loin d'être uniforme; la proportion de glucoside formée s'était accrue d'une façon très régulière à mesure qu'on avait employé plus de ferment. En employant le macéré correspondant à 1 gr. ou à 2 gr. de levure, on a obtenu exactement la même proportion de glucose combiné, soit 53,15 pour 100 du glucose mis en œuvre.

Il s'ensuit qu'à partir d'une certaine proportion de glucosidase α , les quantités de cette dernière, comme cela avait été constaté pour l'émulsine, deviennent sans influence sur la limite de la réaction.

Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau suivant :

MACÉRÉ CORRESPONDANT à :	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	ROTATION à l'arrêt de la réaction	PROPORTION de glucose combiné à l'arrêt
0 gr.,025 poudre de levure	(1)	+ 1° 2'	3,01 pour 100
0 gr.,05 — —		+ 1° 2'	3,59 —
0 gr.,10 — —		+ 1° 6'	6,41 —
0 gr.,15 — —	30-40 jours	+ 1° 14'	11,56 —
0 gr.,20 — —	60-80 —	+ 1° 34'	21,86 —
0 gr.,25 — —	120-140 —	+ 1° 52'	34,20 —
0 gr.,50 — —	40-43 —	+ 2° 8'	50,43 —
1 gr. — —	22-25 —	+ 2° 10'	53,15 —
2 gr. — —	11-15 —	+ 2° 10'	53,15 —

(1) En raison de la faible proportion de glucose combiné dans les premiers essais, on n'a pu fixer la durée de la réaction.

On doit conclure de ces résultats que, si on introduit dans un mélange fermentaire une quantité de glucosidase α suffisante, la proportion de glucose combinée à l'arrêt de la réaction sera toujours la même, quelle que soit la proportion de ferment employée. La réaction s'effectuera d'autant plus rapidement que l'enzyme sera en plus grande quantité. Par contre, si on emploie une quantité de ferment trop faible, la proportion de glucose combinée variera dans de très larges limites avec la proportion d'enzyme employée; elle sera d'autant plus faible que cette dernière se trouvera elle-même en plus petite quantité. Dans ce cas, la réaction, très lente, se prolongera parfois très longtemps, sans jamais atteindre l'état normal d'équilibre entre le glucoside formé et ses composants.

Il est bien entendu que la proportion minima de levure nécessaire à l'obtention d'une synthèse maxima sera variable

avec l'activité de cette levure. Dans le cas présent, il a fallu pour atteindre l'état d'équilibre, employer le macéré correspondant à une quantité de levure comprise entre 0 gr.,50 et 1 gr. Aussi, toutes les expériences relatées dans les essais qui vont suivre ont été effectuées en employant, pour 100 cm³ de mélange fermentaire, une proportion de macéré correspondant au moins à 1 gr. de levure, de façon à éviter toute erreur due à l'emploi d'une quantité trop faible de ferment.

CHAPITRE III.

Influence du titre alcoolique sur la synthèse biochimique des d-glucosides α de différents alcools.

Les premières recherches effectuées sur la synthèse biochimique du méthylglucoside α et de l'éthylglucoside α (1) ont montré que, alors que l'émulsine n'est pas détruite par des solutions alcooliques de titre élevé, la glucosidase α , beaucoup plus sensible, n'agit que dans des alcools (méthylique ou éthylique) renfermant au moins 65 ou 70 % d'eau.

J'ai cherché à approfondir l'étude de cette action nocive de différents alcools sur la glucosidase α . En particulier, j'ai envisagé les 2 points suivants : fixation du degré alcoolique le plus favorable pour la synthèse et détermination de celui où la glucosidase α est immédiatement détruite.

J'ai opéré sur des liqueurs renfermant des proportions des différents alcools étudiés, croissant de 2 gr. en 2 gr. pour 100 cm³ de mélange fermentaire. Chacun de ces liquides renfermait, en outre, pour 100 cm³, sensiblement 1 gr. de glucose d pur et 20 cm³ d'un macéré filtré préparé en laissant en contact pendant 24 heures, à la température du laboratoire, une par-

(1) Em. BOURQUELOT, H. HÉRISSEY et M. BRIDEL. — Synthèse de glucosides α à l'aide de la glucosidase α , enzyme contenu dans la levure basse, séchée à l'air : Méthylglucoside α et éthylglucoside α ; *Journ. de Pharm. et de Chim.* (7), VII, p. 145, 1913, et : Sur la destruction de la glucosidase α en milieu alcoolique ; *Id.*, (7), VII, p. 233, 1913.

tie de levure de bière basse séchée dans 20 parties d'eau. Les flacons ont été abandonnés à la température de 18-20° et la détermination de la rotation polarimétrique, pratiquée sur une petite portion de la liqueur filtrée, a été faite tous les 4 jours jusqu'à l'arrêt de la réaction, qui a été constaté par l'égalité de 2 rotations consécutives. La proportion de glucose combinée a été déterminée en soustrayant du glucose mis en œuvre la quantité de ce sucre restant à l'arrêt de la réaction.

Essais effectués dans l'alcool méthylique additionné de toluène (1).

On a préparé, comme il vient d'être indiqué, 20 mélanges fermentaires renfermant des proportions d'alcool méthylique croissant de 2 gr. en 2 gr., de 0 à 40 gr. pour 100 cm³. Comme les termes inférieurs de la série renfermaient une proportion d'alcool méthylique insuffisante pour empêcher le développement éventuel des microorganismes, chaque liquide a été additionné de 2 cm³ de toluène pour 100 cm³.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

(1) Les résultats auxquels ont abouti ces essais ont été publiés antérieurement : A. ARNRY, Influence du titre alcoolique sur la synthèse biochimique du méthylglucoside α par la glucosidase α ; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), IX, p. 19, 1914.

TITRE ALCOOLIQUE du mélange fermentaire	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	ROTATION A L'ARRÊT de la réaction	PROPORTION DE GLUCOSE COMBINÉ
0	0	+ 58' (1)	0
2 gr. pour 100 cm ³	1-4 jours	+ 1° 12'	12,4 pour 100
4 — —	1-4 —	+ 1° 20'	18,7 —
6 — —	1-4 —	+ 1° 30'	25,6 —
8 — —	12-16 —	+ 1° 42'	37,8 —
10 — —	16-20 —	+ 1° 50'	45,6 —
12 — —	20-24 —	+ 1° 58'	47,6 —
14 — —	32-38 —	+ 2° 6'	51,2 —
16 — —	24-28 —	+ 2° 10'	55,6 —
18 — —	20-24 —	+ 2° 4'	54,1 —
20 — —	20-24 —	+ 2° 2'	50,5 —
22 — —	16-20 —	+ 1° 48'	47,6 —
24 — —	16-20 —	+ 1° 34'	32,6 —
26 — —	12-16 —	+ 1° 24'	22,6 —
29 — —	12-16 —	+ 1° 14'	12,4 —
30 — —	1-4 —	+ 1° 6'	8,4 —
32 — —	1-4 —	+ 1°	5,2 —
34 — —	1-4 —	+ 1°	1,9 —
36 — —		+ 1°	0,3 —

(1) Les rotations initiales étaient sensiblement de + 58' ; ce chiffre, très légèrement inférieur à celui qui correspond à une solution de glucose à 1 gr. pour 100 cm³, s'explique par ce fait que la macération de levure apporte une petite quantité de produits lévogyres.

On voit que, même pour des liquides renfermant une très faible quantité d'alcool, la réaction synthétisante est appréciable. Ainsi, dans un liquide renfermant seulement 2 gr. d'alcool méthylique pour 100 cm³, on a constaté la disparition de 0 gr.,124 de glucose, ce qui correspond à la combinaison de 12,4 pour 100 du glucose en solution. (1).

La réaction synthétisante, comme il fallait le prévoir, est d'autant plus considérable que la teneur du liquide en alcool est plus forte. Cependant, nous voyons la synthèse diminuer dans les liquides d'un degré alcoolique supérieur à 46 gr. dans 100 cm³ ; c'est qu'alors intervient un facteur qui n'est autre que la destruction du ferment par l'alcool. Cette destruction, lente dans des alcools d'un titre voisin de 46 gr. dans 100 cm³, devient de plus en plus rapide à mesure que le degré alcoolique s'élève, pour s'effectuer d'une façon immédiate dans un liquide renfermant, pour 100 cm³, de 34 à 36 gr. d'alcool méthylique.

Il ne saurait être question, dans les liquides renfermant plus de 46 gr. d'alcool pour 100 cm³, d'un équilibre atteint normalement entre le glucoside formé et ses composants, entre l'action synthétisante et l'action hydrolysante du ferment ; dans ces conditions, il faut compter avec une destruction plus ou moins rapide de ce dernier.

A l'appui de cette opinion, on pouvait présumer, en ajoutant dans ces solutions (sans modifier sensiblement le volume du mélange) de nouveau ferment à mesure qu'il se fait une destruction de la glucosidase α , obtenir une synthèse plus considérable. Nous verrons plus loin qu'il en a bien été ainsi.

(1) Si on calcule, d'après les quantités de sucre réducteur (glucose), trouvées à l'arrêt de la réaction, les rotations qui doivent correspondre à une réaction supposée s'exercer uniquement dans le sens de la synthèse du méthylglucoside α , on constate que les valeurs ainsi calculées sont toujours légèrement différentes de celles qui ont été fournies par l'expérience ; c'est ainsi qu'on a trouvé dans certains cas des différences par défaut de quelques minutes. Ce fait peut s'expliquer facilement si on se rappelle que la levure de bière employée peut contenir, en faible quantité, à côté de la glucosidase α , un certain nombre d'autres ferments dont quelques-uns, tels que la glucosidase β , peuvent agir, quoique faiblement, dans des directions contraires à celle de la glucosidase α .

Si nous comparons les résultats précédents avec ceux obtenus par Em. BOURQUELOT et Em. VERDON (1) dans l'étude de l'action synthétisante de l'émulsine, conduisant à la formation du méthylglucoside β , nous constatons que la glucosidase α , dans les limites où l'alcool n'intervient pas comme agent destructeur du ferment, provoque, de la même façon que l'émulsine une synthèse d'autant plus importante que le titre alcoolique est plus élevé.

Il faut cependant noter que, dans des solutions alcooliques de titre égal, la glucosidase α opère une synthèse beaucoup plus considérable que l'émulsine. Ainsi, dans un liquide renfermant 1 gr. de glucose et 10 gr. d'alcool méthylique pour 100 cm³, l'émulsine combine, d'après Em. BOURQUELOT et Em. VERDON, 0 gr.,208 de glucose, alors que la glucosidase α , d'après les recherches précédentes, en combine 0 gr.,456, soit plus du double. Un fait analogue s'observe d'ailleurs dans toutes les solutions renfermant au maximum 16 gr. d'alcool méthylique pour 100 cm³.

Essais effectués dans l'alcool méthylique sans toluène.

Quelques essais spéciaux m'avaient montré que le toluène, ajouté à une solution aqueuse d'alcool méthylique, devait augmenter la toxicité de cet alcool vis-à-vis de la glucosidase α , de telle sorte que la réaction serait notablement différente en l'absence de cet antiseptique.

Il ne pouvait, d'autre part, être question de supprimer le toluène dans les liquides fermentaires renfermant moins de 18 gr. d'alcool méthylique dans 100 cm³, car on se serait exposé à des erreurs dues à une disparition du glucose, provoquée par des microorganismes.

On a préparé une série d'essais renfermant, pour 100 cm³,

(1) Em. BOURQUELOT et Em. VERDON. — La réversibilité des actions fermentaires : émulsine et méthylglucoside β ; *Journ. de Pharm. et de Chim.* (7), VII, p. 377, 1913 — et VERDON : *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1913.

4 gr. de glucose, la quantité de macéré de levure correspondant à 4 gr. de cette dernière et des proportions d'alcool méthylique croissant de 2 gr. en 2 gr., de 10 à 24 gr. On a suivi au polarimètre la marche de la réaction et dosé le glucose restant à l'arrêt, comme il a été indiqué au début de ce chapitre.

Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau suivant :

TITRE ALCOOLIQUE du mélange fermentaire	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	ROTATION à l'arrêt	PROPORTION de glucose combiné à l'arrêt
10 gr. pour 100 cm ³	16-20 jours	+ 1° 52'	45 pour 100
12 — —	18-22 —	+ 2° 2'	
14 — —	18-22 —	+ 2° 6'	50,2 —
16 — —	18-22 —	+ 2° 12'	54,0 —
18 — —	35-38 —	+ 2° 20'	59,0 —
20 — —	35-38 —	+ 2° 24'	59,6 —
22 — —	44-48 —	+ 2° 26'	60,1 —
24 — —	31-35 —	+ 2° 12'	54,0 —

On constatera que, pour des proportions d'alcool méthylique inférieures à 46 gr. pour 100 cm³, les rotations polarimétriques sont presque identiques dans des liquides de même titre alcoolique, soit qu'on ait ajouté du toluène dans les mélanges fermentaires, soit qu'on n'ait pas employé d'antiseptique.

Par contre, dans les liquides non toluénés, la rotation polarimétrique et la proportion de glucose combinée atteignent leur maximum pour une teneur en alcool de 22 gr. dans 100 cm³. On a vu que, en présence de toluène, le maximum était atteint lorsque le mélange fermentaire renfermait 46 gr. d'alcool méthylique dans 100 cm³. L'alcool méthylique

se montre donc notablement plus toxique en présence de toluène qu'en son absence.

Par suite, on peut combiner une proportion de glucose notablement plus grande en supprimant le toluène, puisqu'on arrive ainsi à combiner 60,1 pour 100 du glucose mis en œuvre, alors qu'en présence de cet antiseptique, on ne pouvait opérer la synthèse que de 55,6 pour 100 de ce glucose.

Nous concluons donc que, lorsque l'addition de cet antiseptique n'est pas rendue nécessaire par la faible teneur en alcool du mélange, elle doit être évitée, puisqu'elle diminue sensiblement le rendement en glucose combiné (1).

Nous voyons bien, par cette expérience, que les chiffres indiqués comme représentant la limite de l'action synthétisante de la glucosidase α ne valent que dans les conditions strictes dans lesquelles ces expériences ont été réalisées, puisque la suppression du toluène modifie notablement l'équilibre final de la réaction dans les solutions renfermant de 16 à 24 gr. d'alcool méthylique pour 100 cm³. Nous verrons plus loin qu'une faible élévation de température modifie également la marche et l'équilibre de la réaction.

D'après les résultats précédents, on peut considérer que l'état d'équilibre normal entre le glucoside formé et ses composants, ne s'établit que dans les liquides fermentaires renfermant moins de 22 gr. d'alcool méthylique dans 100 cm³. S'il en est ainsi, on doit constater une reprise de l'action fermentaire en ajoutant, dans les liquides de concentration légèrement toxique, un extrait riche en glucosidase α (sans modification sensible du volume du mélange fermentaire), à mesure qu'il se fait une destruction du ferment.

J'ai constaté, en effet, qu'il en est bien ainsi.

Le liquide renfermant 24 gr. d'alcool méthylique dans 100 cm³ a été additionné, après arrêt de la réaction à $+2^{\circ}12'$,

(1) On a vu, précédemment, que l'addition de toluène à l'eau destinée à la préparation du macéré de levure n'avait ultérieurement aucune influence fâcheuse sur la marche de la synthèse. L'excès de toluène non dissous se trouve, dans ce cas, éliminé par filtration, et la très faible quantité de cet antiseptique qui est entrée en solution dans le macéré ne modifie pas sensiblement la marche de la réaction

de l'extrait sec correspondant à 3 gr. de levure. On a constaté une reprise de la réaction qui s'est traduite par une augmentation de la rotation polarimétrique, de $+ 2^{\circ}12'$ à $+ 2^{\circ}26'$.

Il ressort donc nettement que, pour des liquides de concentration alcoolique supérieure à la concentration optima, la réaction s'arrête avant d'avoir atteint l'équilibre fermentaire, puisque l'addition d'une nouvelle quantité de ferment après l'arrêt de la synthèse peut provoquer la reprise de la réaction synthétisante.

Essais effectués dans l'alcool éthylique (1).

J'ai préparé une série de liquides renfermant chacun, pour 100 cm³, 1 gr. de glucose-d, la quantité de macéré aqueux de levure de bière basse correspondant à 1 gr. de ce produit et des proportions d'alcool éthylique croissant de 2 gr. en 2 gr., de 0 à 40 gr.

Comme le toluène possède, en présence d'alcool méthylique, une certaine toxicité vis-à-vis de la glucosidase α , on a présumé qu'il en serait de même dans les solutions fermentaires renfermant de l'alcool éthylique. Aussi, on n'a additionné de cet antiseptique que les 6 premiers termes de la série, dont la proportion d'alcool était insuffisante pour éviter le développement éventuel des microorganismes.

Tous les flacons ont été abandonnés à la température du laboratoire (18-20°) et la marche de la réaction suivie de la façon indiquée dans les essais précédents.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

(1) Ces essais, ainsi que ceux relatifs à l'action de la glucosidase α dans des alcools propyliques de différents titres, ont été publiés antérieurement : Em. BOURQUELOT et A. AUBRY.— Influence du titre alcoolique sur la synthèse biochimique de l'éthylglucoside α et du propylglucoside α ; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), IX, p. 62, 1914.

TITRE ALCOOLIQUE du mélange fermentaire	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	ROTATION A L'ARRÊT	PROPORTION de glucose combiné à l'arrêt
0	0	+ 1°	0
2 gr. pour 100 cm ³	1-4 jours	+ 1° 6'	6,9 pour 100
4 — —	1-4 —	+ 1° 10'	10,0 —
6 — —	1-4 —	+ 1° 14'	14,0 —
8 — —	8-14 —	+ 1° 20'	19,4 —
10 — —	8-14 —	+ 1° 24'	20,6 —
12 — —	8-14 —	+ 1° 26'	22,9 —
14 — —	8-14 —	+ 1° 30'	26,7 —
16 — —	14-20 —	+ 1° 34'	29,7 —
18 — —	20-24 —	+ 1° 38'	31,2 —
20 — —	31-35 —	+ 1° 46'	32,6 —
22 — —	31-35 —	+ 1° 50'	31,7 —
24 — —	28-31 —	+ 1° 48'	30,0 —
26 — —	24-28 —	+ 1° 40'	28,7 —
28 — —	14-20 —	+ 1° 30'	25,6 —
30 — —	14-20 —	+ 1° 12'	14,4 —
32 — —	1-4 —	+ 1° 8'	8,2 —
34 — —	1-4 —	+ 1° 6'	
36 — —		+ 1° 2'	5,2 —

Comme on le voit, et conformément à la loi générale, la proportion de glucose combinée au moment de l'arrêt de la réaction est d'autant plus grande que le titre alcoolique est plus élevé.

S'il en est autrement lorsque ce titre dépasse 20 gr. dans 100 cm³, c'est que la glucosidase α est détruite dans les liquides plus riches en alcool, et cela d'autant plus rapidement qu'il y a plus d'alcool, de telle sorte que le ferment a disparu avant que la réaction ait atteint l'équilibre normal entre le glucoside et ses composants.

Nous ferons ici une remarque identique à celle qui a été faite précédemment en comparant les proportions de glucose combinées à l'arrêt de la réaction, sous forme de méthylglucoside β et sous celle de méthylglucoside α , dans des alcools de même titre alcoolique. Si on compare les proportions de glucose combinées à l'alcool éthylique sous l'influence de l'émulsine, indiquées par COIRRE (1), aux résultats inscrits dans le tableau précédent, on voit que, dans des solutions alcooliques de titre égal, la glucosidase α opère une synthèse beaucoup plus considérable que l'émulsine.

Ainsi, dans une solution d'alcool éthylique à 10 gr. pour 100 gr., l'émulsine combine 4,3 pour 100 du glucose mis en œuvre, alors que, dans une solution alcoolique à 10 gr. pour 100 cm³, la glucosidase α en combine 20,6 pour 100, soit presque 5 fois d'avantage. Dans une solution éthylique à 20 gr. pour 100 gr., l'émulsine effectue la synthèse de 15,6 pour 100 du glucose et la glucosidase α 32,6 pour 100 (dans une solution à 20 gr. pour 100 cm³), soit sensiblement le double (2).

(1) *Loc. cit.*, p. 20.

(2) Il faut remarquer que les solutions employées par COIRRE renferment un *poids* déterminé d'alcool dans 100 gr. de mélange final, alors que celles qui ont servi au cours de ce travail renferment un *poids* déterminé d'alcool dans un *volume total* de 100 cm³ de mélange fermentaire. Aussi, il n'est pas rigoureusement exact de comparer les résultats obtenus dans ces travaux, dans des solutions renfermant le même poids d'alcool. Cependant, l'erreur faite en faisant ces comparaisons est très faible dans les solutions de faible titre alcoolique. Ainsi, une solution renfermant 10 gr. d'alcool éthylique et une quantité d'eau suffisante pour compléter le poids de 100 gr., occupe, à 15°, un volume de 101 cm³7, et une solution contenant 20 gr. d'alcool dans 100 gr. de mélange à un volume de 103 cm³ environ.

Essais effectués dans l'alcool propylique normal.

Ces essais ont été effectués avec de l'alcool propylique normal, déshydraté sur du chlorure de calcium anhydre et redistillé. On a opéré sur des liquides renfermant des proportions d'alcool propylique croissant de 2 gr. en 2 gr., de 0 à 20 gr., le ferment étant détruit dans des liquides plus riches en alcool. Chacun des mélanges fermentaires renfermait en outre, comme ceux dont il vient d'être question, 1 gr. de glucose pur et une quantité de macéré aqueux de levure basse, desséchée, correspondant à 1 gr. de ce produit.

Les mélanges ont été abandonnés à la température du laboratoire (18-20°) ; on a effectué sur ces liquides des examens polarimétriques et des dosages de sucre réducteur de la même façon que sur les solutions méthyliques et éthyliques précédemment étudiées.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

TITRE ALCOOLIQUE du mélange fermentaire	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	ROTATION POLARIMÉTRIQUE à l'arrêt	PROPORTION DE GLUCOSE COMBINÉ
0	0	+ 1°	0
2 gr. pour 100 cm ³	1-4 jours	+ 1° 6'	5,6 pour 100
4 — —	1-4 —	+ 1° 8'	8,6 —
6 — —	1-4 —	+ 1° 10'	9,3 —
8 — —	4-8 —	+ 1° 12'	11,7 —
10 — —	8-13 —	+ 1° 16'	16,3 —
12 — —	8-13 —	+ 1° 20'	17,4 —
14 — —	8-13 —	+ 1° 22'	17,9 —
16 — —	8-13 —	+ 1° 20'	19,4 —
18 — —	4-8 —	+ 1° 12'	15,6 —
20 — —	1-4 —	+ 1° 6'	5,8 —

Dans l'ensemble, les choses se passent donc avec l'alcool propylique comme avec l'alcool méthylique et l'alcool éthylique ; les proportions de glucose combinées, s'élèvent d'abord avec la teneur du liquide en alcool, pour diminuer ensuite.

Mais, tandis que la destruction de la glucosidase α se manifeste seulement, dans les alcools méthylique et éthylique, à partir d'une teneur en alcool de 20 à 22 gr. pour 100 cm³; elle se produit déjà dans une solution renfermant seulement 16 gr. d'alcool propylique pour 100 cm³.

En outre, alors que toute activité du ferment est arrêtée dans un liquide renfermant seulement 20 à 22 gr. de ce dernier alcool pour 100 cm³, il faut environ 34 à 36 gr. des 2 alcools précédents pour produire le même résultat.

L'alcool propylique possède donc, vis à vis de la glucosidase α , une toxicité beaucoup plus considérable que l'alcool méthylique et l'alcool éthylique.

Essais effectués dans l'alcool butylique.

On a employé, au cours de ces essais, l'alcool butylique du commerce, qu'on a deshydraté sur du carbonate de potassium sec, puis distillé au bain d'huile à 116°.

On a préparé des mélanges renfermant, dans 100 cm³, 1 gr. de glucose, 20 cm³ de macéré aqueux de levure à 1 pour 20, et des quantités d'alcool butylique croissant de 2 gr. en 2 gr., de 0 à 10 gr. On n'a pu préparer de solutions alcooliques plus concentrées, en raison de la faible solubilité de l'alcool butylique dans l'eau. Chaque mélange fermentaire a été additionné de 2 cm³ de toluène, afin d'éviter toute possibilité de destruction du glucose par des microorganismes. Les flacons ont été placés à 18-20° ; la marche de la réaction a été suivie au moyen d'examens polarimétriques, et le sucre réducteur dosé à l'arrêt de la réaction.

Les résultats sont contenus dans le tableau suivant :

TITRE ALCOOLIQUE du mélange fermentaire	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	ROTATION à l'arrêt de la réaction	PROPORTION de glucose combiné
0	0	+ 1° 2'	0
2 gr. pour 100 cm ³	Moins de 14 jours	+ 1° 4'	1,0 pour cent
4 — —	— —	+ 1° 6'	2,1 —
6 — —	— —	+ 1° 10'	3,2 —
8 — —	(Pas de réaction).	+ 1° 2'	0
10 — —	(Pas de réaction).	+ 1° 2'	0

Si nous comparons les proportions de glucose combinées dans les solutions renfermant l'alcool butylique avec celles qui sont entrées en réaction dans les solutions méthyliques,

éthyliques et propyliques de même titre alcoolique, nous constatons que, à mesure que nous employons des alcools de poids moléculaires plus élevés, la proportion de glucose combinée est plus faible. Ainsi, dans l'alcool méthylique à 6 gr. pour 100 cm³, il se combine 25,6 pour 100 du glucose mis en œuvre. Cette proportion tombe à 14 pour 100 dans l'alcool éthylique de même titre, à 9,3 pour 100 dans l'alcool propylique et à 3,2 pour 100 dans une solution d'alcool butylique renfermant 6 gr. de cet alcool dans 100 cm³.

On en trouvera une première explication dans ce fait que la proportion de glucose combinée doit être fonction du nombre de molécules d'alcool avec lesquelles ce sucre est en contact. Or, à mesure que les poids moléculaires des alcools deviennent plus élevés, le nombre de molécules contenues dans un même poids de ces différents alcools devient de plus en plus faible. Toutefois, si les proportions de glucose combinées aux alcools méthylique, éthylique, propylique semblent sensiblement proportionnelles aux poids moléculaires de ces alcools, il n'en est plus de même dans les solutions renfermant l'alcool butylique.

Il est possible que, même aux doses très faibles où cet alcool peut être employé, il possède vis-à-vis de la levure une action nocive suffisante pour empêcher l'équilibre fermentaire d'atteindre sa limite normale entre le glucoside formé et ses composants. Il est également vraisemblable que le toluène, dont on n'a pu éviter l'emploi, possède, en présence d'alcool butylique, une certaine toxicité vis-à-vis de la glucosidase α . On constatera d'ailleurs que la toxicité de l'alcool butylique vis-à-vis de la glucosidase α est beaucoup plus grande que celle des alcools précédents puisque, à la dose de 8 gr. dans 100 cm³ de mélange fermentaire, il détruit totalement l'activité synthétisante de la levure. Il faut cependant remarquer que, à cette dose, l'alcool butylique ne peut se dissoudre entièrement dans le mélange fermentaire, de telle sorte qu'on peut attribuer la destruction immédiate de la glucosidase α au contact de cet enzyme avec la petite portion d'alcool non dissous. Peut-être obtiendrait-on de meilleurs rendements en butylglucoside α , si la réaction pouvait s'exer-

cer dans un liquide neutre, capable de faire entrer *en solution* une proportion plus considérable d'alcool butylique.

Essais effectués dans l'alcool isobutylique.

On a effectué ces essais avec l'alcool isobutylique du commerce (Kalbaum), en suivant exactement la marche qui a été indiquée dans les expériences se rapportant à l'alcool butylique normal.

Les résultats sont contenus dans le tableau suivant :

TITRE ALCOOLIQUE du mélange fermentaire	DURÉE de la réaction	ROTATION à l'arrêt de la réaction	PROPORTION de glucose combiné
0	0	+ 1° 4'	0
2 gr. pour 100 cm ³	Moins de 15 jours	+ 1° 6'	0,54 pour 100
4 — —	id.	+ 1° 8'	1,1 —
6 — —	id.	+ 1° 10'	2,2 —
8 — —	id.	+ 1° 12'	3,3 —
10 — —	id.	+ 1° 6'	1,1 —

En comparant ces résultats avec ceux que nous a fournis l'étude de la synthèse du butylglucoside α dans des alcools butyliques de différentes concentrations, on constate que l'alcool isobutylique s'est montré un peu moins toxique vis-à-vis de la glucosidase α , que l'alcool butylique normal. Ce fait tient vraisemblablement à ce que, à la dose de 8 gr. dans 100 cm³, il est entièrement soluble dans l'eau, de telle sorte que le ferment ne peut se trouver en contact avec de l'alcool non dissous, comme le cas se présente pour une même dose d'alcool butylique normal. A la dose de 12 gr. dans 100 cm³ du mélange, une petite partie de l'alcool isobutyli-

que se trouvant non dissous, provoque une destruction immédiate du ferment.

Les résultats obtenus au cours des expériences relatés dans ce chapitre peuvent être résumés dans le tableau suivant, dans lequel on trouvera réunies :

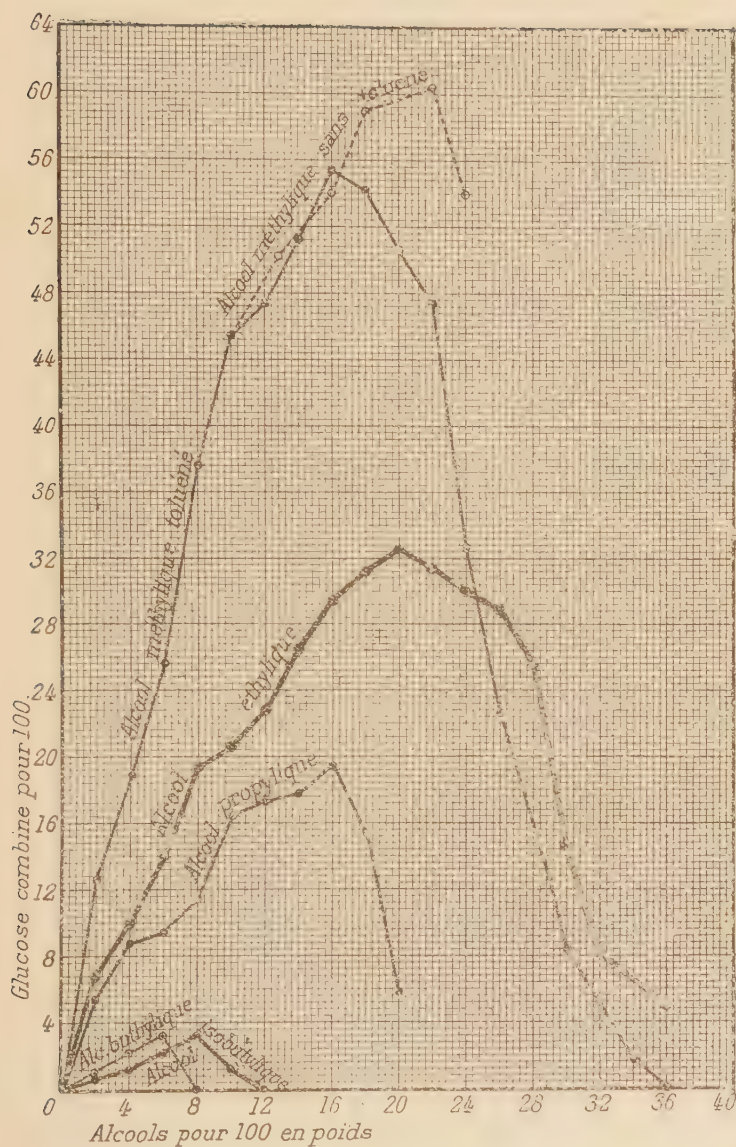
1° La proportion de chacun des alcools étudiés, dans lesquels on obtient, dans les mêmes conditions de l'expérience (1 gr. de glucose pour 100 cm³, glucosidase α en quantité suffisante, température de 18-20°), le meilleur rendement en glucoside formé.

2° La proportion de glucose combinée dans des mélanges fermentaires qui renferment la proportion de chacun des alcools la plus favorable à la synthèse.

3° La proportion de chacun des alcools étudiés nécessaire pour déterminer une destruction immédiate du ferment.

NATURE DE L'ALCOOL	Proportion d'alcool déterminant une synthèse maxima	Proportion de glucose combiné dans la proportion d'alcool optimal	Proportion d'alcool déterminant une destruction immédiate
Alcool méthylique	22gr. dans 100 cm ³	60,1 pour 100	34-36 gr dans 100 cm ³
— éthylique	20 — —	32,6 —	36-40 —
— propylique	16 — —	19,4 —	20-22 —
— butylique	6 — —	3,2 —	8 —
— isobutylique	8 — —	3,3 —	10-12 —

Les résultats de ces expériences peuvent être représentés par des courbes obtenues en portant en abscisses les différentes proportions de chacun des alcools introduites dans les mélanges fermentaires, et en ordonnées les proportions de glucose correspondantes.



Ces courbes partent du point O, représentatif de l'eau pure tenant en solution 1 gr. de glucose dans 100 cm³ ; elles s'élèvent toutes d'une façon régulière, jusqu'à un maximum correspondant à la teneur en alcool des mélanges fermentaires donnant le meilleur rendement en glucosides.

Puis chaque courbe décroît progressivement pour venir rejoindre l'axe des X en un point correspondant à la proportion d'alcool nécessaire pour amener la destruction immédiate de la glucosidase α .

La première partie de chacune de ces courbes, seule, peut être considérée comme représentant l'état d'équilibre entre le glucoside formé et ses composants ; la seconde, qui se complique du fait de la destruction du ferment par chacun des alcools, peut être variable suivant la proportion de ferment introduite dans le mélange fermentaire.

CHAPITRE IV.

Influence de la proportion de glucose sur la limite de la synthèse.

Em. BOURQUELOT et VERDON (1) et COIRRE (2) ont établi que la proportion pour 100 de glucose combiné par l'émulsine, dans des solutions renfermant une proportion fixe d'alcool méthylique ou d'alcool éthylique, variait très peu avec la teneur en glucose du mélange fermentaire. Ils ont pu effectuer la synthèse du méthylglucoside β et de l'éthylglucoside β dans des liquides renfermant jusqu'à 20 gr. de glucose dans 100 cm³, sans voir le rendement proportionnel en glucoside diminuer sensiblement.

Il était intéressant de vérifier si la glucosidase α agissait de même. Dans ce but, j'ai préparé des mélanges fermentaires renfermant, dans 100 cm³, 18 gr. d'alcool méthylique, 40 cm³ d'un macéré aqueux de levure à 1 gr. pour 20 cm³ et des proportions de glucose croissant de 1 à 15 grammes.

On a employé une assez forte proportion de levure, afin de n'avoir pas à craindre un arrêt prématuré de la réaction, dû à une lente destruction du ferment.

Les mélanges fermentaires ont été placés à la température ordinaire du laboratoire (18-20°). On a pratiqué sur eux des

(1) Em. BOURQUELOT et Em. VERDON. — De l'emploi de proportions croissantes de glucose dans la synthèse biochimique du méthylglucoside β ; *Journ. de Pharm. et de Chim.* (7), VII, p. 575, p. 1913.

(2) *Loc. cit.*, p. 35.

examens polarimétriques fréquents, et dosé le glucose à l'arrêt de la réaction.

Les résultats de ces expériences sont groupés dans le tableau suivant :

GLUCOSE pour 100 cm ³	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	ROTATION initiale	ROTATION finale	PROPORTION de GLUCOSE COMBINÉ
1 gr.	22-31 jours	+ 4° 2'	+ 2° 18'	57,5 pour 100
2 —	30-40 —	+ 2° 6'	+ 1° 40'	57,8 —
5 —	60-70 —	+ 5° 18'	+ 11° 39'	54,7 —
10 —	150-180 —	+ 10° 34'	+ 22° 16'	52,4 —
15 —	180-210 —	+ 15° 52'	+ 30° 26'	44,6 —

La réaction synthétisante s'est effectuée rapidement (20 à 40 jours) dans les mélanges fermentaires renfermant 1 gr. et 2 gr. de glucose pour 100 cm³. La durée de la réaction a été beaucoup plus considérable dans les solutions renfermant plus de 5 gr. de glucose, et elle a atteint 7 mois environ dans les solutions renfermant 15 gr. de glucose dans 100 cm³.

Le dosage du glucose, pratiqué à l'arrêt de la réaction, montre que les proportions de ce sucre qui sont entrées en combinaison dans les différentes solutions ne sont pas rigoureusement identiques. Dans les mélanges renfermant 1 et 2 gr. de glucose pour 100 cm³, les proportions centésimales de sucre combinées sont sensiblement les mêmes : 57,5 pour 100 dans le premier et 57,8 pour 100 dans le second. Cette proportion est déjà notablement plus faible dans les solutions renfermant 5 gr. de glucose par 100 cm³. Elle n'est plus que de 52,4 pour 100 dans les solutions renfermant 10 gr. de glucose, et de 44,6 pour 100 dans la solution contenant 15 gr. de sucre dans 100 cm³ de mélange fermentaire.

On pourra s'expliquer cette différence entre les proportions de glucose combinées dans les solutions de concentra-

tions variées, parce fait, mis en évidence par CROFT-HILL (1), que la levure de bière basse renferme un ferment possédant, dans des solutions concentrées de glucose, la propriété de combiner entre elles deux ou plusieurs molécules de ce sucre. Il y aurait formation d'un sucre nouveau, appelé *révertose*, dont les propriétés sont jusqu'ici assez peu connues, mais qu'on sait cependant être réducteur. Or, une solution aqueuse de glucose renfermant 15 gr. de ce sucre dans 100 cm³, subit déjà sensiblement l'action de ce ferment. J'ai pu constater, dans une telle solution, en l'absence d'alcool, une augmentation de la rotation polarimétrique de 32', ainsi que la disparition de 3,3 pour 100 du pouvoir réducteur.

On conçoit donc que si cette polymérisation du glucose s'effectue également en présence d'alcool, la proportion de glucose capable de se combiner à l'alcool méthylique dans des solutions sucrées assez concentrées doit être sensiblement inférieure à la quantité de ce sucre qu'on a mise en solution, puisqu'il y a condensation d'une partie du glucose.

Le révertose formé réduit encore la liqueur de Fehling, mais n'est probablement plus susceptible de se combiner à l'alcool méthylique.

On peut trouver une seconde explication de la diminution notable du rendement centésimal en glucose combiné dans les solutions renfermant une forte proportion de ce sucre, par ce fait que l'accumulation dans les solutions d'une notable proportion de glucoside doit entraver la marche de l'action synthétisante de la glucosidase α .

On peut conclure de ces faits que, lorsqu'on effectue la synthèse des glucosides α , il est préférable de ne pas opérer en présence d'une trop forte proportion de glucose, car les rendements en glucoside sont de moins en moins satisfaisants à mesure que la proportion de sucre est plus grande. De plus, la durée de la réaction devient de plus en plus longue, à moins qu'on n'augmente dans les mêmes proportions la quantité de glucosidase α introduite dans le mélange fermentaire. Or, l'introduction dans le mélange d'une forte proportion de macéré de levure, peut rendre ultérieurement difficile l'ex-

(1) *Loc. cit.*

traction du glucoside formé, en raison des impuretés introduites en même temps que la glucosidase α .

Enfin, on peut s'exposer, en employant de fortes proportions de glucose, à effectuer, en même temps que la synthèse du glucoside désiré, celle de substances résultant de la combinaison de 2 ou de plusieurs molécules de glucose.

Pratiquement, il ne semble pas y avoir avantage à faire entrer dans le mélange fermentaire plus de 5 gr. de glucose dans 100 cm³. Encore devra-t-on, dans ce cas, employer au minimum la quantité de macéré de levure correspondant à 2 gr. de cette dernière, dans 100 cm³ de liquide final.

CHAPITRE V.

Essais de synthèse en présence d'un liquide neutre, étranger à la réaction.

Essais de synthèse en présence d'acétone.

Les recherches effectuées par EM. BOURQUELOT et EM. VERDON (1) ont montré que l'émulsine peut exercer son action synthétisante en présence d'un liquide neutre étranger à la réaction.

C'est ainsi qu'ils ont pu obtenir du méthylglucoside β en faisant agir l'émulsine sur une solution alcoolique de glucose renfermant une forte proportion d'acétone.

J. COIRRE (2) a pu de même obtenir, par voie biochimique, de l'éthylglucoside β dans un milieu fortement acétonique.

Ces auteurs ont établi que l'acétone ne gênait nullement la réaction synthétisante. On a pu, à la suite de cette constatation, opérer la synthèse de glucosides β dérivés d'alcools fort peu solubles dans l'eau, ce qui aurait été pratiquement impossible en l'absence d'acétone (3).

(1) Recherches sur la synthèse biochimique du méthylglucoside β dans un liquide neutre, étranger à la réaction; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 482, 1913.

(2) *Loc. cit.*, p. 46.

(3) EM. BOURQUELOT et H. HÉRISSEY. — Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine : synthèse d'un glucoside isomère de la salicine, le salicylglucoside β ; (7), VIII, p. 49, 1913.

EM. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Synthèse du géranylglucoside β à l'aide de l'émulsine; *id.*, (7), VIII, p. 204, 1913.

EM. BOURQUELOT et A. LUDWIG. — Synthèse biochimique de l'o-mé-

J'ai fait quelques essais en vue de vérifier si la glucosidase α se comportait comme l'émulsine en milieu acétonique. Dans ce but, j'ai préparé des mélanges fermentaires renfermant chacun, dans 100 cm³, 1 gr. de glucose, 16 gr. d'alcool méthylique et 20 cm³ de macéré de levure à 1 pour 20. Le premier de ces mélanges renfermait 10 cm³ d'acétone pure du bisulfite ; le deuxième 20 cm³. Le troisième mélange, qui devait servir de témoin, ne renfermait pas d'acétone.

On a suivi la marche de la synthèse par des examens polarimétriques et le glucose a été dosé dans chacun des mélanges à l'arrêt de la réaction.

La réaction synthétisante s'est arrêtée, dans chacun des liquides renfermant de l'acétone, avant que l'équilibre normal fût atteint entre le glucoside formé et ses composants.

Ainsi, la rotation polarimétrique du mélange renfermant 10 cm³ d'acétone s'est arrêtée à + 1° 54' ; le dosage du glucose a indiqué la combinaison de 43,4 pour 100 du sucre mis en solution. Le mélange renfermant 20 cm³ d'acétone est passé de + 1° à + 1° 8' et il s'y est combiné 6,7 pour 100 du glucose.

Or, la rotation du témoin ne renfermant pas d'acétone est passée de + 1° à + 2° 42' et il y a eu, dans le mélange, combinaison de 51,9 pour 100 du glucose mis en œuvre.

Ces résultats sont réunis dans le tableau suivant :

PROPORTION D'ACÉTONE	ROTATION POLARIMÉTRIQUE à l'arrêt	PROPORTION DE GLUCOSE combiné
0	+ 2° 12'	51,9 pour 100
10 cm ³ pour 100 cm ³	+ 1° 54'	43,4 —
20 cm ³ pour 100 cm ³	+ 1° 8'	6,7 —

thoxybenzylglucoside β et du m-nitrobenzylglucoside β ; *id.*, (7), IX, p. 441, 1914.

Em. BORQUELOT et A. LUDWIG. — Synthèse biochimique, à l'aide de l'émulsine de, l'anisylglucoside β (p-méthoxybenzylglucoside β) ; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), IX, p. 542, 1914.

On voit donc que la réaction synthétisante est sensiblement gênée par une proportion de 10 cm³ d'acétone dans 100 cm³ de mélange fermentaire, et qu'une quantité double de ce liquide empêche presque totalement l'activité synthétisante de la glucosidase α de se manifester.

Ces faits cadrent très bien avec une expérience inédite de Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. Ces auteurs ont vainement tenté d'isoler la glucosidase α en la précipitant de sa solution dans le macéré aqueux de levure, par addition à ce macéré d'une forte proportion d'acétone. Les précipités qu'ils ont obtenus ainsi se sont toujours montrés inactifs au point de vue de la synthèse des glucosides α .

On ne peut donc compter opérer la synthèse des glucosides α en présence d'une forte proportion d'acétone. Ce fait a jusqu'ici empêché la synthèse des glucosides α d'alcools aromatiques d'être effectuée par voie biochimique. On sait en effet que ces alcools sont généralement trop peu solubles dans l'eau pour qu'on puisse effectuer la synthèse biochimique de leurs glucosides dans des solutions aqueuses les renfermant.

Essai de synthèse en présence de toluène.

On a vu précédemment (Chapitre III) que l'addition de toluène aux mélanges fermentaires n'était pas sans inconvénients. On a constaté, en présence de cet antiseptique, une diminution sensible du rendement en glucoside formé. Je ne reviendrai pas ici sur cette question.

CHAPITRE VI.

Influence de la température sur l'action synthétisante de la glucosidase α en présence d'alcool méthylique.

Les recherches effectuées par Em. VERDON (1) sur la température la plus favorable à la synthèse du méthylglucoside β ont établi que l'émulsine présentait son maximum d'activité dans l'alcool méthylique entre 16 et 19°. Par contre J. COIRRE (2) a reconnu que, pour ce qui est de l'éthylglucoside β , il y a avantage à opérer la synthèse à la température de 30°. La composition du milieu dans lequel réagit le ferment peut donc avoir une influence notable sur la température la plus favorable à l'action de cet enzyme. A plus forte raison devait-on prévoir qu'un autre ferment présenterait une température optimale d'action qui serait différente.

Je me suis proposé de vérifier si la glucosidase α se montrait plus ou moins active à une température supérieure à celle du laboratoire. Dans ce but, j'ai déterminé d'abord la température de destruction immédiate du ferment dans des liquides alcooliques, en l'absence de glucose.

J'ai ensuite opéré quelques essais de synthèse à une température supérieure à la température ordinaire, mais inférieure à la température de destruction immédiate précédemment déterminée.

1 *Loc. cit.*, p. 27.

(2) *Loc. cit.*, p. 23.

Ce chapitre renferme donc deux séries d'expériences :

1^{re} Détermination de la température de destruction de la glucosidase α en milieu alcoolique.

2^e Essais de synthèse à la température de 30°.

Détermination de la température de destruction immédiate.

Cette détermination a été effectuée par le procédé institué par Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL (1) au cours de leurs recherches sur la destruction de l'émulsine dans l'alcool éthylique.

J'ai effectué 2 séries d'expériences; dans la première, la glucosidase α se trouvait en solution dans de l'alcool méthylique à 10 gr. pour 100 cm³, tandis que, dans la seconde série, le mélange alcoolique renfermait 20 gr. d'alcool méthylique pour 100 cm³. Il était superflu de faire des essais dans des solutions alcooliques plus concentrées puisque, comme des essais consignés au Chapitre III le démontrent, ces liquides ont une action nocive sur le ferment même à la température de 18-20°.

On a mesuré, dans des tubes à essai, 20 cm³ de macéré aqueux de la levure de bière basse, correspondant à 1 gr. de levure séchée, et 5 cm³ d'alcool méthylique à 50 gr. pour 100 cm³ (préparé en ajoutant, à 50 gr. d'alcool méthylique absolu, une quantité d'eau distillée suffisante pour compléter le volume de 100 cm³). On a obtenu ainsi, dans chaque tube à essai une solution de ferment dans un liquide hydro-alcoolique renfermant, pour 100 cm³, 10 gr. d'alcool méthylique.

Une autre série a été préparée en ajoutant à 20 cm³ du même macéré de levure, 10 cm³ d'une solution aqueuse d'alcool méthylique renfermant 6 gr. d'alcool méthylique absolu, de telle sorte que chaque tube à essai contenait le ferment

1) Sur la température de destruction de l'émulsine dans des alcools éthyliques de différents titres : *Journ de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 27, 1913.

dans un milieu méthylique renfermant 20 gr. d'alcool pour 100 cm³.

Les tubes à essai, soigneusement bouchés, ont été placés dans un bain-marie dont la température initiale était de +17°; ce bain-marie a été chauffé de telle sorte que la température du contenu des tubes s'élevait de 1° centigrade toutes les 2 minutes. On a enlevé le premier tube de chaque série lorsque la température s'était élevée à 25°, le 2^e à 30°, le 3^e à 35° en continuant de même jusqu'à 60°. Le contenu de chaque tube a été, après refroidissement, versé dans un flacon jaugé de 100 cm³; on a complété le volume de 100 cm³ avec 10 cm³ de solution de glucose à 1 gr. pour 10 cm³ et une quantité d'eau suffisante contenant, pour les tubes de la première série, 13 gr.,50 d'alcool méthylique, et 40 gr. de ce même alcool pour les tubes de la 2^e série.

Chaque échantillon de levure chauffé se trouvait donc réparti dans 100 cm³ d'un mélange renfermant finalement 1 gr. de glucose et 46 gr. d'alcool méthylique; comme on l'a constaté au Chapitre III, cette proportion d'alcool n'exerce, à froid, aucune action nocive sur le ferment. On a placé dans les mêmes conditions, à titre de témoin, un échantillon de levure n'ayant pas subi l'action de la chaleur.

Ces mélanges fermentaires ont été examinés tous les 4 jours au polarimètre jusqu'à l'arrêt de la réaction synthétisante. Les échantillons de levure les moins chauffés de chaque série se sont montrés aussi actifs que le témoin n'ayant pas subi l'action de la chaleur. La rotation polarimétrique de chacun des mélanges fermentaires correspondant aux échantillons de levure ayant supporté une température plus élevée, se sont révélés moins actifs; il a fallu un laps de temps plus considérable pour permettre à ces liquides d'atteindre la rotation polarimétrique de + 2°8'. Il y avait donc eu destruction d'une partie de la glucosidase α . Ces échantillons de ferment altérés ont effectué leur synthèse en un temps compris entre 20 et 50 jours.

Enfin, les macérés de levure de la première série ayant subi une température supérieure à 50° et ceux de la seconde série retirés au-dessus de 45° avaient perdu toute activité, et

on n'a pu constater aucune augmentation de la rotation polarimétrique dans les mélanges fermentaires les contenant.

Les résultats de cette expérience se trouvent résumés dans le tableau suivant :

TITRE ALCOOLIQUE du liquide chauffé	TEMPÉRATURE PROVOQUANT UNE DIMINUTION D'ACTIVITÉ	TEMPÉRATURE déterminant une destruction totale immédiate
10 gr. alcool méthylique dans 100 cm ³	40° à 45°	50° à 55°
20 gr. alcool méthylique dans 100 cm ³	35° à 40°	45° à 50°

Ces résultats montrent que la glucosidase α est beaucoup plus sensible que l'émulsine à l'action de la chaleur. En effet, d'après Em. VERDON (1), l'émulsine est détruite par l'alcool méthylique à 10 gr. pour 100 cm³ entre 65° et 70°. Nous avons vu précédemment, dans le même ordre d'idées, que l'alcool exerçait à froid sur la glucosidase α une action profondément nocive dans des conditions dans lesquelles l'émulsine ne subit aucune altération.

Essais de synthèse à la température de 30°.

D'après les températures de *destruction immédiate* indiquées plus haut, il était évident que la marche de tout essai de synthèse, effectué à une température supérieure à 35°, serait faussée, de ce fait que cette température amène, d'une façon immédiate, une diminution d'activité du ferment dans l'alcool à 20 gr. pour 100 cm³. On pouvait, par contre, espérer obtenir de bons résultats, en plaçant le mélange fermentaire à une température comprise entre 20° et 35°.

(1) *Loc. cit.*, p. 31.

J'ai effectué un essai à la température de 30° avec des mélanges fermentaires renfermant : 1 gr. de glucose, 20 cm³ de macéré de levure à 1 pour 20 et 5, 10, 15, 20, 25 gr. d'alcool méthylique dans 100 cm³. Afin de pouvoir comparer d'une façon sûre les résultats obtenus à la température ordinaire et ceux obtenus à 30°, chaque mélange fermentaire a été partagé en 2 parties égales, dont l'une a été placée à l'étuve à 30°, tandis que l'autre restait à la température de 18-20°.

La marche de la réaction a été suivie au polarimètre et le sucre réducteur dosé dans tous les liquides à l'arrêt de la réaction.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

DEGRÉ ALCOOLIQUE du mélange fermentaire	LIQUIDE MAINTENU A LA TEMPÉRATURE ORDINAIRE		LIQUIDE MAINTENU A 30°	
	Rotation à l'arrêt	Glucose combiné pour 100	Rotation à l'arrêt	Glucose combiné pour 100
5 gr. dans 100 cm ³	+ 1° 30'	28,9	+ 1° 22'	22,4
10 — —	+ 1° 52'	43,9	+ 1° 30'	27,4 (1)
15 — —	+ 2° 10'	51,1	+ 1° 38'	27,4
20 — —	+ 2° 24'	60,5	+ 1° 20'	12,1
25 — —	+ 1° 58'	44,6	+ 1° 10'	5,8

Ces résultats montrent nettement que la réaction synthétisante est toujours moins active dans les liquides alcooliques maintenus à 30° que dans les témoins placés à la température de 18-20°. L'action nocive de la chaleur est moins accentuée, quoique déjà notable dans les alcools de faible concentration. Ainsi, dans l'alcool à 5 gr. pour 100 cm³, la propor-

(1) La proportion de glucose combiné trouvée dans cet essai est inférieure à la quantité correspondant normalement à la rotation du mélange. Cette erreur provient sans doute d'une légère évaporation du mélange fermentaire dans un flacon mal bouché.

tion de glucose combinée est seulement de 22,4 pour 100 à 30°, tandis que le témoin a combiné 28,9 pour 100 de son glucose. A mesure que le titre alcoolique du mélange s'élève, on constate de plus en plus nettement l'influence fâcheuse de la température. Ainsi, dans l'alcool à 20 gr. pour 100 cm³, la proportion de glucose combinée n'est plus que de 12,4 pour 100 à 30°, alors que le témoin a effectué la synthèse de 60,5 pour 100 du glucose mis en œuvre. Pour une concentration alcoolique de 25 gr. dans 100 cm³, la proportion de glucose combinée à 30° n'est plus que de 5,8 pour 100, ce qui indique une destruction très rapide du ferment.

L'action destructive de l'alcool sur le ferment, à la température de 30° est donc suffisante, même dans les alcools de faible concentration, pour empêcher l'action de la glucosidase α d'atteindre l'état d'équilibre normal entre le glucoside formé et ses composants, dans chaque milieu déterminé.

Cette destruction s'effectue, dans l'alcool à 15 gr. pour 100 cm³ en un temps inférieur à 8 jours et dans les alcools de concentration égale ou supérieure à 20 gr. pour 100 cm³, en un laps de temps compris entre 1 et 4 jours.

Ces faits nous prouvent que l'optimum d'action de la glucosidase α en milieu méthylique, optimum que nous avons vu correspondre à une teneur du mélange fermentaire en alcool de 20 à 22 gr. dans 100 cm³, ne correspond qu'à une réaction effectuée à la température habituelle de nos laboratoires.

Cette proportion d'alcool méthylique se trouverait, pour un climat chaud, très fortement toxique, et nous pouvons même conclure que si, dans des régions soumises à un tel climat, on ne prenait soin de refroidir les mélanges fermentaires, les rendements maxima obtenus en glucoside seraient amoindris dans des proportions considérables, variables d'ailleurs avec le climat considéré.

CHAPITRE VII.

Etude des conditions expérimentales les mieux appropriées à la préparation du méthylglucoside α et de l'éthylglucoside α .

Les conditions les meilleures d'obtention du méthylglucoside α et de l'éthylglucoside α par voie biochimique nous seront indiquées par la comparaison des résultats obtenus au cours des diverses séries d'expériences relatées dans ce travail.

PRÉPARATION DU MÉTHYLGLUCOSIDE α .

Il nous faut d'abord déterminer la teneur en alcool du mélange fermentaire dans lequel le meilleur rendement en glucoside sera obtenu. Si nous observons la courbe représentant la synthèse du méthylglucoside α , nous constatons que la solution renfermant 22 gr. d'alcool méthylique pour 100 cm³ est celle où la proportion de glucose combinée est la plus considérable. Cependant, la courbe présente une légère inflexion à partir d'une teneur en alcool de 18 gr., ce qui semble correspondre déjà à une faible action nocive de l'alcool sur le ferment. Comme la durée de la réaction sera assez longue, il y a intérêt à employer un alcool légèrement moins concentré, afin d'éviter toute destruction du ferment par

l'alcool. Nous opérerons donc dans un mélange renfermant, dans 100 cm³, 18 gr. d'alcool méthylique pur.

Quelle proportion de glucose devons-nous adopter ?

On a vu précédemment que l'emploi de fortes proportions de glucose était peu recommandable, en raison de la diminution du rendement centésimal en glucoside formé, et aussi de la durée considérable de la réaction.

D'autre part, l'utilisation de solutions renfermant seulement 1 gr. de glucose pour 100 cm³, présente l'inconvénient de nécessiter l'emploi d'un volume considérable de mélange fermentaire ; par suite, il faut employer une très forte quantité d'alcool méthylique, dont une grande partie reste inutilisée à la fin de la réaction. Or, la récupération d'un alcool aussi dilué est difficile, tout au moins dans un laboratoire de recherches. En effet, la distillation d'un tel mélange fournit, si l'on ne possède pas d'appareils destinés à opérer le fractionnement des vapeurs distillées, un alcool méthylique très aqueux. De plus, la distillation à sec, sous pression réduite, d'une grande quantité de liquide aqueux est très laborieuse dans un laboratoire.

Il y aura, pour toutes ces raisons, avantage à employer, dans un laboratoire, une solution plus concentrée de glucose, bien que le rendement en glucoside formé soit moins bon.

En conséquence, nous indiquerons deux méthodes de préparation du méthylglucoside α . La première, qui est pratiquement la meilleure à employer dans un laboratoire, ne donne pas le rendement maximum en glucoside, et n'est pas la plus économique, mais elle est la plus facile à réaliser.

La seconde, qui pourrait être industrielle, permet, à la faveur d'une installation plus importante, d'obtenir le méthylglucoside α de la façon la plus économique.

Préparation de laboratoire. — Nous emploierons, comme il a été indiqué plus haut, un mélange fermentaire renfermant 18 gr. d'alcool méthylique et 5 gr. de glucose dans 100 cm³. Le rendement en glucoside rapporté au glucose, obtenu ainsi, est légèrement plus faible que le rendement maximum obtenu avec une solution renfermant, dans

100 cm³, 1 gr. de glucose et 22 gr. d'alcool méthylique, mais il est néanmoins encore satisfaisant.

On a vu que la réaction, dans une telle solution, dure plus de 2 mois, même si on introduit dans 100 cm³ de mélange fermentaire le macéré de levure correspondant à 2 gr. de cette dernière. Il y a, d'autre part, intérêt à employer la plus faible quantité de levure compatible avec une réaction suffisamment énergique, afin d'introduire dans le mélange fermentaire le moins possible d'impuretés. Nous introduirons, dans 100 cm³ de mélange, un macéré correspondant à 3 gr. de levure sèche.

Cette quantité sera suffisante pour que la réaction s'opère en 6 semaines environ.

On a vu précédemment que l'alcool méthylique possède une action nocive immédiate sur la glucosidase α lorsqu'il n'est pas suffisamment dilué. Nous devons donc, avant d'ajouter le ferment, mélanger l'alcool avec une quantité d'eau distillée telle que le mélange ne renferme pas plus de 30 gr. d'alcool méthylique dans 100 cm³; le mélange d'alcool et de glucose correspondant à 100 cm³ de liquide final devra donc occuper un volume minimum de 60 cm³, avant l'addition de la glucosidase α . Par suite, le macéré de levure (correspondant à 3 gr. de cette dernière) devra occuper un volume maximum de 40 cm³; aussi, nous préparerons ce macéré en mettant la levure en contact, durant 24 heures, avec 10 fois son poids d'eau distillée toluénée; à la température de 18-20°.

En résumé, pour obtenir pratiquement 120 à 200 gr. de méthylglucoside α ; on préparera le mélange suivant :

Glucose purifié du commerce.....	500 gr.
Alcool méthylique pur	1.800 gr.
Macéré aqueux de levure basse à 1 pour 10	3.000 cm ³
Eau distillée, quantité suffisante pour. . .	10 litres.

Ce mélange doit être effectué de la façon suivante : on introduit l'alcool méthylique dans un flacon de 10 litres, puis on y ajoute les 500 gr. de glucose préalablement dissous dans 3 litres 500 d'eau distillée. Après agitation du mélange, on y

ajoute le macéré de levure préalablement filtré, et on complète le volume de 10 litres avec de l'eau distillée.

Le mélange fermentaire est maintenu à la température de 18-20° jusqu'à ce que la rotation polarimétrique, qui primitivement était de $+ 5^{\circ}18'$ environ ait atteint de $+ 11^{\circ}$ à $+ 11^{\circ}30'$; la réaction est alors sensiblement terminée.

L'extraction du méthylglucoside formé s'opère de la façon suivante :

On porte le liquide à l'ébullition pour détruire la glucosidase α qui pourrait, dans la suite, opérer en milieu aqueux l'hydrolyse du glucoside; on prend soin, au préalable, de neutraliser l'acidité du liquide par un peu de carbonate de calcium, afin d'éviter à chaud l'action hydrolysante des acides sur le méthylglucoside α .

Le liquide neutralisé, bouilli et filtré est ensuite distillé au bain-marie bouillant, sous pression réduite, jusqu'à réduction au volume de 5 litres. L'alcool méthylique en excès se trouve ainsi éliminé, et il reste dans le ballon une solution aqueuse de glucose et de méthylglucoside α renfermant sensiblement une égale proportion de ces deux corps.

Pour éliminer l'excès de glucose libre, on ajoute au liquide environ 10 gr. de levure fraîche des boulangers par litre. La fermentation alcoolique du glucose commence immédiatement; lorsque le dégagement de gaz carbonique cesse (habituellement au bout de 3 à 8 jours), on filtre le liquide, on le neutralise par le carbonate de calcium, on le porte à l'ébullition, on le filtre à nouveau, puis on l'évapore jusqu'à dessiccation complète au bain-marie bouillant, sous pression réduite.

L'extrait sec, qui contient le méthylglucoside α mélangé à des impuretés amenées par le macéré renfermant la glucosidase α , et par la levure ajoutée en vue de la fermentation du glucose restant, est repris par 500 cm³ d'alcool à 95°, à l'ébullition, à reflux. La solution alcoolique est filtrée bouillante. Après refroidissement, il se forme une abondante cristallisation de méthylglucoside α légèrement coloré. On opère de nouvelles reprises par l'alcool à 95° bouillant, jusqu'à ce que l'alcool n'abandonne plus de cristaux par refroi-

dissement. Les cristaux obtenus sont essorés à la trompe, lavés avec un peu d'alcool à 95° et purifiés par recristallisation. Pour cela, on dissout le méthylglucoside impur dans 40 parties d'alcool à 95° bouillant, on filtre et on laisse refroidir en agitant fréquemment, de manière à obtenir une cristallisation troublée. On obtient ainsi des cristaux parfaitement blancs. Si l'on veut obtenir le méthylglucoside α cristallisé en longues aiguilles, il suffit d'opérer une nouvelle dissolution, dans 10 parties d'alcool à 95°, en laissant la cristallisation s'opérer lentement, et sans agiter la solution alcoolique.

J'ai pu obtenir par ce procédé, et en employant les proportions de glucose et d'alcool indiquées, 150 gr. environ de méthylglucoside α ; cette proportion aurait pu être plus considérable, car on a arrêté la réaction synthétisante avant que l'équilibre fermentaire ait été complètement atteint.

La méthylglucoside α obtenu, séché à l'air, présentait un pouvoir rotatoire $\alpha_D = + 157^{\circ},95$.

$$(\alpha = + 4^{\circ}, 933, p = 0 \text{ gr.}, 3904, v = 25 \text{ cm}^3, l = 2, t = + 16^{\circ})$$

Son point de fusion a été trouvé de 168° au tube capillaire (corrigé) et de 168°-169° au bloc de Maquenne.

Préparation industrielle. — Si le méthylglucoside α devait être préparé d'une façon industrielle, et par suite, de la façon la plus économique qu'il soit possible, on aurait avantage à opérer d'une façon différente.

Il faudrait employer des mélanges fermentaires renfermant 1 ou 2 gr. de glucose et 22 gr. d'alcool méthylique pour 100 cm³. La proportion centésimale de glucose combinée serait ainsi légèrement supérieure à celle qui entre en combinaison lorsqu'on emploie le procédé précédent.

Lorsque la rotation polarimétrique cesserait d'augmenter, on distillerait une partie de la liqueur au moyen d'un appareil à plateaux, de façon à récupérer l'excès d'alcool méthylique, après quoi on opérerait exactement de la façon qui a été indiquée précédemment. La liqueur distillée pourrait ser-

vir à une nouvelle opération, après détermination de son titre alcoolique et ajustage convenable.

PRÉPARATION DE L'ÉTHYLGLUCOSIDE α .

Les notions relatives à l'obtention du méthylglucoside α s'appliquent intégralement à la préparation du mélange fermentaire dans lequel s'effectue la synthèse biochimique de l'éthylglucoside α . Toutefois, on a tout avantage, dans la préparation du liquide fermentaire, à employer de l'alcool éthylique à 95° plutôt que de l'alcool absolu. Dans ces conditions, la formule du mélange fermentaire devient :

Glucose purifié du commerce..	500 gr.
Alcool à 95°.....	1.917 gr. (1.800 gr. alcool absolu).
Macéré aqueux de levure à 1 p: 10.....	3.000 cm ³ .
Eau distillée quantité suffisante pour	10 litres.

On doit préparer cette solution en prenant les précautions qui ont été indiquées précédemment, en vue de l'obtention du mélange fermentaire destiné à la préparation du méthylglucoside α .

On laisse le mélange à la température ordinaire, jusqu'à ce que la rotation polarimétrique soit passée de $+5^{\circ}18'$ à $+8^{\circ}$ environ. Le liquide est ensuite traité de la même façon que le mélange renfermant le méthylglucoside α ; on le fait bouillir après neutralisation par le carbonate de calcium, on distille l'excès d'alcool, on élimine le glucose au moyen de la levure des boulangers et on distille à sec sous pression réduite.

Toutefois, le glucoside ne peut être obtenu cristallisé, à partir de l'extrait, de la même façon que le méthylglucoside α . L'éthylglucoside α est en effet extrêmement soluble dans l'alcool, et, en raison des impuretés qui sont entraînées avec lui en solution alcoolique, il ne cristallise pas par refroidissement, même après amorçage avec une trace d'éthylglucoside α cristallisé.

Pour obtenir l'éthylglucoside α cristallisé, on opère de la façon suivante :

L'extrait sec renfermant le glucoside est épuisé à plusieurs reprises par de l'alcool à 95° bouillant. Les solutions alcooliques filtrées sont distillées à siccité ; l'extrait alcoolique obtenu est repris plusieurs fois de suite par 500 cm³ d'éther acétique anhydre bouillant, à reflux. Les solutions éthéroacétiques, filtrées chaudes et amorcées avec une trace d'éthylglucoside α cristallisé, abandonnent, après refroidissement de l'éthylglucoside α cristallisé en longues et fines aiguilles. Il faut au moins 3 litres d'éther acétique pour enlever la presque totalité de l'éthylglucoside α contenu dans l'extrait.

J'ai pu obtenir, par ce procédé, et avec ces doses de glucose et d'alcool, environ 50 gr. d'éthylglucoside α .

Pour purifier le glucoside, on le fait recrystalliser une ou deux fois dans l'acétone ; on le dissout à chaud dans 10 parties environ d'acétone pure du commerce et on filtre la solution bouillante. L'éthylglucoside α cristallise avant que le refroidissement de la liqueur soit complet.

Le pouvoir rotatoire de l'éthylglucoside α , recrystallisé 2 fois dans l'acétone et séché à l'air a été trouvé $\alpha_D = + 150,9$.

$$(\alpha = + 2^{\circ},966, p = 0 \text{ gr.}, 2456, \nu = 25 \text{ cm}^3, l = 2, t = + 21^{\circ})$$

Son point de fusion a été trouvé de $+ 110^{\circ}$ au bloc de Maquenne.

CHAPITRE VIII.

Sur la spécificité de la glucosidase α .

La glucosidase α n'a été jusqu'ici trouvée en quantité pratiquement utilisable pour les recherches de l'ordre de celles reportées dans ce travail, que dans la levure de bière de fermentation basse, séchée à l'air,

Or, cette levure renferme indiscutablement un certain nombre d'autres ferments, dont la glucosidase α ne semble pas avoir été, dans beaucoup de travaux antérieurs, bien nettement différenciée. C'est ainsi que certains auteurs semblent rattacher au même ferment le pouvoir d'hydrolyser à la fois le maltose et les glucosides α ; la glucosidase α et la maltase constitueraient le même enzyme.

Cette conception ne paraît guère acceptable à l'heure actuelle ; c'est ainsi que Em. BOURQUELOT et H. HÉRISSEY (1) en particulier ont montré que la maltase et la glucosidase α semblent être des ferments spécifiquement distincts ; les recherches qui suivent, effectuées dans le but d'apporter quelques éclaircissements à cette question ont fourni des résultats qui permettent de conclure dans le sens de la spécificité des diastases envisagées.

J'ai d'abord cherché à isoler de la levure basse une maltase exempte de glucosidase α . Dans ce but, un macéré aqueux

(1) Du choix de la levure dans l'application des procédés biochimiques à la recherche des sucres et des glucosides ; *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 246, 1912.

de levure de bière basse à 1 gr. pour 10 cm³ a été additionné de son volume d'alcool à 95°. On a recueilli le précipité floconneux qui s'est formé au sein du mélange, et on l'a séché dans le vide sulfurique. Après dessiccation et pulvérisation, on a obtenu une poudre grise, presque totalement insoluble dans l'eau. On en a introduit 0 gr. 20 dans 100 cm³ d'une solution aqueuse de maltose renfermant 1 gr. de ce sucre, et on a ajouté 2 cm³ de toluène. Le flacon a été placé à l'étuve à 40°, ainsi qu'une solution de maltose non additionnée de ferment, et qui devait servir de témoin. On n'a constaté, même au bout de plusieurs jours, aucun retour vers la gauche de la rotation polarimétrique du mélange fermentaire.

La maltase avait donc été détruite au cours de sa précipitation ou pendant la dessiccation du précipité.

Une autre expérience a été tentée en centrifugeant le précipité obtenu par addition au macéré de levure de son volume d'alcool à 95°, et en introduisant immédiatement ce précipité, encore humide, dans une solution aqueuse de maltose. Ce produit ne s'est pas montré plus actif sur le maltose que le précipité desséché.

Dans ces conditions, la glucosidase α (comme des expériences relatives précédemment nous l'ont montré) est sûrement détruite, mais comme la maltase l'est également, il nous est impossible de tirer de ces essais une conclusion quelconque relative à l'identité ou à la non identité des 2 ferments.

En présence de ces insuccès, j'ai cherché à utiliser d'autres sources de maltase, et à vérifier si les produits qui renferment une certaine proportion de ce ferment sont également capables d'hydrolyser le méthylglucoside α .

En un mot, il s'agissait de vérifier si l'hydrolyse du maltose et celle du méthylglucoside α s'opéraient toujours d'une façon parallèle, quelle que soit la source de maltase employée. Si l'on pouvait trouver un produit riche en maltase et n'hydrolysant que très faiblement le méthylglucoside α , la preuve de la non identité de la maltase et de la glucosidase α serait faite. Cette preuve devait être encore plus convaincante si on trouvait une source de ferment totalement inactive sur l'un des composés et susceptible d'opérer le dédoublement de l'autre,

J'ai d'abord employé l'urine humaine fraîche, dans laquelle DUBOURG (1) a signalé la présence de la maltase.

J'ai mis en solution 1 gr. de maltose dans 100 cm³ d'urine et j'ai ajouté 2 cm³ de toluène, pour assurer l'asepsie du mélange. D'autre part, 1 gr. de méthylglucoside α a été dissous dans 100 cm³ d'urine toluénée. On a préparé, à titre de contrôle, des témoins renfermant : l'un 1 gr. de maltose dans 100 cm³ d'eau toluénée, le second 1 gr. de méthylglucoside α et le dernier de l'urine pure. L'urine employée s'est montrée peu riche en maltase, puisque la rotation polarimétrique de la solution renfermant le maltose n'est passée, en 21 jours, à l'étuve à 30°, que de + 2° 32' à + 2° 8'. En 56 jours, cette rotation est passée à + 1° 30', alors que, dans les mêmes conditions, un mélange riche en maltase aurait opéré l'hydrolyse presque totale du maltose en moins de quelques jours.

Pendant ce laps de temps, on n'a constaté aucune hydrolyse dans le mélange fermentaire renfermant le méthylglucoside α ; la rotation polarimétrique est restée la même (+ 3° 8') et il n'y a pas eu apparition de sucre réducteur dans la solution.

On doit conclure de cette expérience que l'urine employée était à la vérité peu riche en maltase, mais, fait capital, qu'elle ne renfermait pas trace de glucosidase α . Toutefois, en raison de la faible activité de la maltase étudiée, j'ai cherché à opérer avec une autre source de ferment.

On sait qu'une culture d'*Aspergillus niger* (*Sterigmato-cystis nigra*) sur liquide de Raulin, retirée de l'étuve au bout de 2 jours, lavée à l'eau et mise en contact durant 2 jours avec une certaine quantité d'eau distillée, lui abandonne un certain nombre de ferments, parmi lesquels se trouve la maltase (2).

Ce liquide présente l'avantage d'être sensiblement incolore, neutre au tournesol, non réducteur. Je l'ai introduit, à la dose de 20 cm³, dans une solution aqueuse de maltose telle

(1) *Thèse Doct. es-Sciences* ; Paris, 1889.

(2) Em. BOUTQUÉLOT. — Recherches sur les propriétés physiologiques du maltose ; *Journ. de l'anatomie et de la physiologie*, p. 162, 1886.

que le mélange final renfermât, dans 100 cm³, 1 gr. de ce sucre.

On a préparé de même une solution aqueuse de méthylglucoside α renfermant, dans 100 cm³, 1 gr. de ce glucoside et 20 cm³ du même liquide d'*Aspergillus* ; les solutions ont été additionnées de toluène, et on les a placées à l'étuve à 30°. Au bout de 48 heures, la rotation polarimétrique du mélange renfermant le maltose est passée de $+2^{\circ}36'$ à $+4^{\circ}10'$ ce qui correspond à l'hydrolyse presque totale du maltose. Un témoin, renfermant la même quantité de maltose sans liquide d'*Aspergillus* a conservé, durant ce temps, sa rotation initiale de $+2^{\circ}36'$.

La rotation polarimétrique ($+3^{\circ}10'$) du mélange fermentaire renfermant le méthylglucoside α n'a pas varié durant ce laps de temps, et on n'a pas pu y déceler la moindre trace de glucose au moyen de la liqueur de Fehling. On doit donc admettre qu'il n'y a pas eu d'hydrolyse du méthylglucoside α (on sait d'ailleurs que l'hydrolyse du méthylglucoside α par la glucosidase α , est très rapide et que, au bout de 2 jours, une solution aqueuse de méthylglucoside α à 1 gr. pour 100 cm³, renfermant une certaine proportion de glucosidase α aurait été presque entièrement hydrolysée ; sa rotation polarimétrique serait devenue voisine de $+4^{\circ}$ et on y aurait constaté la présence de glucose).

Nous devons conclure de ces faits que le liquide d'*Aspergillus*, qui renferme cependant une maltase très active, ne dédouble pas sensiblement le méthylglucoside α .

On ne peut donc pas considérer la maltase comme étant identique à la glucosidase α . Nous sommes en présence de 2 ferments distincts, qui existent simultanément dans la levure de fermentation basse.

CONCLUSIONS.

On peut résumer de la façon suivante les conclusions qui ont été déjà rapportées à la suite de chaque série d'expériences relatées dans ce travail.

1° La glucosidase α s'emploiera de préférence sous forme d'un macéré obtenu en laissant en contact 24 heures, à la température du laboratoire, 1 partie de levure de bière, séchée à l'air, avec 10 à 20 parties d'eau distillée additionnée d'une petite quantité de toluène.

Si certaines expériences nécessitent l'emploi du ferment sous une forme telle qu'il n'occupe pas de volume appréciable, on préparera un extrait de levure en évaporant à froid, dans le vide, *en présence de chlorure de calcium anhydre*, un macéré aqueux de levure à 1 gr. pour 5 cm³.

2° Lorsque les quantités de ferment employées sont très faibles, la limite de la réaction varie dans de très larges proportions avec la quantité d'enzyme, probablement en raison de la destruction graduelle de ce dernier. A partir d'une proportion minima déterminée de glucosidase α , la quantité de ferment mise en œuvre n'influe pas sur la limite de la réaction ; elle n'est qu'un facteur de rapidité.

3° La glucosidase α , introduite dans des solutions renfermant, pour 100 cm³, 1 gr. de glucose et des proportions croissantes des alcools méthylique, éthylique, propylique, butylique, isobutylique, provoque la formation des glucosides α dérivés de ces alcools ; la proportion de glucoside formée est constante pour un alcool déterminé de titre donné ; elle augmente régulièrement avec le titre alcoolique

du mélange fermentaire, jusqu'à ce que la concentration du liquide en alcool devienne nocive pour le ferment ; la proportion de glucose combinée devient alors de plus en plus faible à mesure que le titre alcoolique s'élève, et elle devient nulle lorsque la proportion d'alcool est suffisante pour déterminer la destruction immédiate du ferment.

Les proportions de glucose combinées dans des solutions renfermant respectivement un même poids de chacun des alcools étudiés sont d'autant plus faibles que les poids moléculaires des alcools sont plus élevés.

4° Le rapport final entre le glucose combiné à l'alcool méthylique et le glucose total introduit dans des solutions renfermant un poids déterminé d'alcool, est fixe lorsque les solutions renferment moins de 5 gr. de glucose dans 100 cm³.

Lorsque les mélanges fermentaires renferment une plus grande quantité de glucose, la proportion de ce sucre qui entre en combinaison devient plus faible, ce qui peut être dû à des réactions accessoires et aussi à l'action paralysante exercée sur la glucosidase α par l'accumulation, dans le mélange, de la grande quantité de glucoside formé.

5° L'introduction d'une faible proportion d'acétone pure du bisulfite dans un mélange fermentaire renfermant 16 gr. d'alcool méthylique dans 100 cm³, provoque une diminution notable de l'activité de la glucosidase α . La réaction synthétisante est presque nulle lorsque le mélange renferme un cinquième de son volume d'acétone.

6° La température de 18-20° est celle qui semble la plus favorable à la synthèse ; à la température de 30°, la glucosidase α est lentement détruite, même en présence de solutions renfermant une très faible proportion d'alcool méthylique.

7° Pour obtenir rapidement une grande quantité de méthylglucoside α ou d'éthylglucoside α , on préparera un mélange fermentaire renfermant, dans 100 cm³, 5 gr. de glucose, 18 gr. d'alcool méthylique ou d'alcool éthylique, et 30 cm³ d'un macéré aqueux de levure basse à 1 gr. pour 10 cm³.

8° La maltase de l'*Aspergillus niger* ne possède pas la propriété de dédoubler le méthylglucoside α .

Cette expérience, ainsi que quelques autres essais relatés dans ce travail, nous permettent de conclure que la maltase et la glucosidase α sont deux ferments spécifiquement différents.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,
BOURQUELOT.

Vu :

Le Directeur de l'Ecole,
H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
L. LIARD.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages.
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE PREMIER.— Etude des différentes formes d'utilisation de la glucosidase α comme agent synthétisant.....	11
CHAPITRE II.— Influence de la proportion de ferment sur la marche de l'action synthétisante	23
CHAPITRE III. — Influence du titre alcoolique sur la synthèse biochimique des glucosides α de différents alcools.....	27
CHAPITRE IV.— Influence de la proportion de glucose sur la limite de la synthèse	43
CHAPITRE V.— Essais de synthèse en présence d'un liquide neutre, étranger à la réaction.....	49
CHAPITRE VI.— Influence de la température sur l'action synthétisante de la glucosidase α en présence d'alcool méthylique	53
CHAPITRE VII.— Etude des conditions expérimentales les mieux appropriés à la préparation du méthylglucoside α et de l'éthylglucoside α	59
CHAPITRE VIII.— Sur la spécificité de la glucosidase α ..	67
CONCLUSIONS	71

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE L. DECLUME, LONS-LE SAUNIER.
